

Vitor Clasen Chaves

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA DE FRUTOS VERMELHOS  
CULTIVADOS NO SUL DO BRASIL E AVALIAÇÃO  
FARMACOLÓGICA DE EXTRATO DE *Rubus* sp. EM MODELO  
ANIMAL DE MANIA E NEUROINFLAMAÇÃO**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Biotecnologia e Biociências

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Cláudia M. O. Simões

Coorientador: Prof. Dr. Flávio H. Reginatto

Florianópolis  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Chaves, Vitor Clasen

Caracterização química de frutos vermelhos cultivados no sul do Brasil e avaliação farmacológica de extrato de Rubus sp. em modelos animais de mania e neuroinflamação / Vitor Clasen Chaves ; orientador, Cláudia Maria Oliveira Simões, coorientador, Flávio Henrique Reginatto, 2017.  
169 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências, Florianópolis, 2017.

Inclui referências.

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Antocianinas. 3. Frutos Vermelhos. 4. Antioxidante. 5. LC/MS/MS. I. Oliveira Simões, Cláudia Maria . II. Reginatto, Flávio Henrique . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências. IV. Título.

**"Caracterização química de frutos vermelhos cultivados no sul do Brasil e avaliação farmacológica de extrato de *Rubus sp.* em modelos animais de mania e neuroinflamação"**

Por

**Vitor Clasen Chaves**

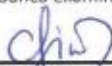
Tese julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (23/PPGBTC/2017) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof. Dr. Mario Steindel

Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



Dr.ª Cláudia Maria Oliveira Simões (Universidade Federal de Santa Catarina)

Orientadora



Dr. Gustavo Micke (Universidade Federal de Santa Catarina)



Dr.ª Samira da Silva Valvassori (Universidade do Extremo Sul Catarinense)



Dr. Eduardo Mongulhott Dalmarco (Universidade Federal de Santa Catarina)

Florianópolis, 18 de dezembro de 2017.



## AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Cláudia Simões, primeiramente pela confiança ao aceitar me orientar como seu aluno de doutorado. Agradeço por todos os conhecimentos repassados e sua experiência extremamente engrandecedora.

Ao meu orientador, Professor Flávio Reginatto, a quem agradeço profundamente por toda paciência nesse longo período (mestrado e doutorado). Sou grato por todos os ensinamentos, nos diversos âmbitos, tanto na área acadêmica como pela amizade, compreensão e parceria em todos os momentos, sendo eles dentro do laboratório ou mesmo nos momentos de descontração fora do laboratório, com certeza, não menos importantes.

Agradeço aos colegas dos laboratórios, seja do Laboratório de Farmacognosia ou do Laboratório de Virologia Aplicada, com os quais convivi e tive o prazer de adquirir muito conhecimento. À Claudinha por toda ajuda e bons momentos de descontração no laboratório. As colegas e amigas Caroline e Simone que fizeram parte de toda essa trajetória na UFSC, e a Larissa, não menos importante apenas mais recente, meu agradecimento por toda a ajuda.

Aos meus irmãos, Fábio e Daniel, por todo o apoio de formas distintas, mas com certeza, ambos merecem esse agradecimento.

Ao meus pais, Morenei e Tânia, pelo apoio incondicional, auxílio em todos os momentos e incentivo a todas as minhas decisões. Com certeza com esse apoio tudo foi muito mais fácil de ser realizado.

À minha noiva Isabel, meu agradecimento especial. Muito obrigado, primeiramente pela paciência, companheirismo, dedicação. Além do incentivo diário, que, com certeza, fez muita diferença nesse período.



## RESUMO

Os frutos vermelhos são mundialmente apreciados devido a sua coloração, textura e sabor delicado. Além disso, esses frutos são ricos em compostos fenólicos, especialmente antocianinas, os quais apresentam diversas atividades farmacológicas, tais como atividades anti-inflamatória, citotóxica e antioxidante, além de benefícios em doenças cardiovasculares e diabetes tipo 2, com potencial redução do risco de obesidade. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo realizar a caracterização química e investigar as potenciais atividades antioxidante, anti-herpética, e citotóxica dos extratos dos frutos de *Eugenia uniflora* L. (pitanga), *Fragaria x ananassa* Duch. (morango), *Psidium castilleianum* S. (araçá), *Rubus* sp. (amora-preta) e *Vaccinium virgatum* (mirtilo), assim como avaliar o potencial preventivo do extrato de amora-preta no comportamento tipo maníaco e na neuroinflamação. Para a caracterização da composição química, foram realizados os doseamentos de fenólicos totais (Folin ciocalteu) e de antocianinas monoméricas totais (pH diferencial), além da identificação e quantificação individual de antocianinas por cromatografia líquida acoplada a detector de arranjo de diodos e espectrometria de massas (CLAE/DAD/EM/EM). Os resultados indicaram teores de compostos fenólicos variando entre 3,82 e 13,55 mg de eq. de ácido gálico por grama de fruto fresco, sendo os frutos do araçá-amarelo os que apresentaram os menores teores e os de morango (cultivar Aromas) os mais elevados. Os frutos de mirtilo, pitanga-roxa e amora-preta apresentaram os maiores teores de antocianinas monoméricas totais, com teores de 120, 71 e 87 mg de eq. de cianidina-3-*O*-glicosídeo por 100 gramas de fruto fresco, respectivamente. Foram detectadas nos frutos deste estudo 21 antocianinas, sendo que dessas, sete foram detectadas pela primeira vez nas respectivas espécies: delfinidina-*O*-galactosídeo, cianidina-*O*-galactosídeo, petunidina-*O*-galactosídeo, pelargonidina-3-*O*-glicosídeo, malvidina-*O*-galactosídeo, malvidina-*O*-pentosídeo e malvidina-*O*-acetilhexosídeo nos frutos de pitanga; e cianidina-3-*O*-glicosídeo nos frutos de araçá. O potencial antioxidante indicou uma correlação positiva com o teor de compostos antociânicos. Os resultados indicaram que os frutos de mirtilo (9,82 mg.mL<sup>-1</sup>) e amora-preta (16,84 mg.mL<sup>-1</sup>) apresentaram os menores valores de EC<sub>50</sub> para os ensaios com o radical DPPH, o que foi confirmado pelo ensaio com o radical ABTS. A avaliação da atividade anti-herpética (HSV-1, cepa KOS), assim como a avaliação da atividade citotóxica frente a três linhagens celulares tumorais

humanas (RD, A549, DU145), não mostraram resultados promissores. Considerando o teor de antocianinas monoméricas totais da amora-preta, foram realizados ensaios *in vivo* para avaliar os efeitos do seu extrato na prevenção dos episódios de mania e do surgimento de processo neuroinflamatório. Os resultados confirmaram a capacidade antioxidante do extrato de *Rubus* sp. no tecido cerebral do animais, nos dois modelos experimentais, bem como a capacidade de impedir a elevação de citocinas pró inflamatórias no modelo de mania induzida por cetamina.

**Palavras-chave:** Antocianinas. Frutos vermelhos. Antioxidante. Transtorno Bipolar. Neuroinflamação.



## ABSTRACT

The berries are appreciated worldwide due to their coloration, texture and delicate flavor. In addition, these fruits are rich in phenolic compounds, especially anthocyanins, which show several pharmacological activities, such as anti-inflammatory, cytotoxic and antioxidant activities, as well as benefits in cardiovascular diseases and type 2 diabetes, and potential reduction of obesity risk. In this context, the present work aimed at the chemical characterization and the investigation of the potential antioxidant, antiherpetic, and cytotoxic activities of fruit extracts of *Eugenia uniflora* L. (*pitanga*), *Fragaria x ananassa* Duch. (strawberry), *Psidium castlleianum* S. (*araçá*), *Rubus* sp. (blackberry) and *Vaccinium virgatum* (blueberry), as well as evaluating the preventive potential of blackberry extract in manic behavior and neuroinflammation. For chemical characterization, total phenolic (Folin ciocalteu) and total monomeric anthocyanins (pH differential) were determined, as well as individual identification and quantification of anthocyanins by liquid chromatography coupled to photodiode array detector and mass spectrometry (HPLC/PDA/MS/MS). The results presented the phenolic compound contents between 3.82 and 13.55 mg of eq. of gallic acid per gram of fresh fruit, the lowest content was detected in the yellow *araçá* and the highest values in strawberry fruit (Aromas cultivar). The fruits of blueberry, purple *pitanga* and blackberry showed the highest content of total monomeric anthocyanins, 120, 71 and 87 mg of eq. of cyanidin-3-*O*-glucoside per 100 grams of fresh fruit, respectively. Twenty one anthocyanins were detected in the fruits of this study, seven of which were detected for the first time in the respective species: delphinidin-*O*-galactoside, cyanidin-*O*-galactoside, petunidin-*O*-galactoside, pelargonidin-3-*O*-glucoside, malvidin-*O*-galactoside, malvidin-*O*-pentoside, and malvidin-*O*-acetylhexoside in *pitanga* fruits; and cyanidin-3-*O*-glucoside in *araçá* fruits. The antioxidant potential indicated a positive correlation with the anthocyanin content. The results indicated that the blueberry fruits (9.82 mg.mL<sup>-1</sup>) and blackberry (16.84 mg.mL<sup>-1</sup>) presented the lowest values of EC<sub>50</sub> for the DPPH radical assays, which was confirmed by the ABTS radical assay. The evaluation of anti-herpetic activity (HSV-1, strain KOS), as well as the evaluation of cytotoxic activity against three human tumor cell lines (RD, A549, DU145), did not show promising results. Considering the total monomeric anthocyanin content of the blackberry, *in vivo* assays were performed to evaluate the effects of its extract on the prevention of manic episodes and the onset of neuroinflammatory process. The results

confirmed the antioxidant capacity of the extract of *Rubus* sp. in the brain tissue of the animals, in both experimental models, as well as the ability to prevent the elevation of proinflammatory cytokines in the ketamine-induced mania model.

**Key-words:** Anthocyanins; Berries; Antioxidant; Bipolar disorder; Neuroinflammation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Frutos de <i>Eugenia uniflora</i> .....	27
Figura 2 – Frutos de <i>Fragaria x ananassa</i> .....	32
Figura 3 - Frutos de <i>Psidium cattleianum</i> .....	39
Figura 4 - Frutos de <i>Rubus</i> sp.....	42
Figura 5 – Frutos de <i>Vaccinium virgatum</i> .....	47
Figura 6 - Cátion flavílio e principais antocianidinas .....	52
Figura 7 - Estruturas de antocianinas em equilíbrio de acordo com o pH .....	54
Figura 8 - Efeitos do extrato de amora-preta ( <i>Rubus</i> sp., 200 mg/kg, via oral) em camundongos expostos ao LPS (250 µg/kg, via i.p.) sobre o estresse oxidativo no córtex cerebral.....	152
Figura 9 - Efeito do extrato de amora-preta ( <i>Rubus</i> sp., 200 mg/kg, via oral) em camundongos expostos ao LPS (250 µg/kg, via i.p.) sobre o estresse oxidativo no hipocampo.....	154
Figura 10 - Efeito do extrato de amora-preta ( <i>Rubus</i> sp., 200 mg/kg, via oral) em camundongos expostos ao LPS (250 µg/kg, via i.p.) sobre o estresse oxidativo no hipocampo.....	156
Figura 11 – Efeitos do extrato de amora-preta ( <i>Rubus</i> sp.) nos níveis séricos das interleucinas IL-10 e IL-6. ....	158



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Principais compostos fenólicos presentes em frutos de <i>Eugenia uniflora</i> L. ....	29
Quadro 2 - Principais compostos fenólicos presentes em pseudofrutos de <i>Fragaria x ananassa</i> Duch. ....	33
Quadro 3 - Principais compostos fenólicos presentes em frutos de <i>Psidium cattleianum</i> .....	40
Quadro 4 - Principais compostos fenólicos presentes em frutos de <i>Rubus</i> sp. ....	44
Quadro 5 - Principais compostos fenólicos presentes em frutos de <i>Vaccinium virgatum</i> .....	48



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMT – Antocianinas monoméricas totais  
ABTS – ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)  
CAT – Catalase  
CC<sub>50</sub> – Concentração que reduz em 50 % a viabilidade celular  
CFH-DA – diacetato de dicloro-di-hidro-fluoresceína  
CI<sub>50</sub> – Concentração que inibe 50 % da infecção viral  
CLUE – Cromatografia líquida de ultra eficiência  
DAD – Detector de arranjo de diodos  
DCF – 2',7'- diclorofluoresceína  
DPPH – 2,2-difenil-1-picrilhidrazil  
EC<sub>50</sub> – Concentração que reduz em 50 % a concentração inicial (DPPH e ABTS)  
EDTA – Ácido etilenodiaminotetracético  
EM/EM – Espectrometria de massas/Espectrometria de massas  
ERO – Espécie reativa de oxigênio  
ERN – Espécie reativa de nitrogênio  
FC – Folin ciocalteu  
FD – Fator de diluição  
FDA – *Food and drug administration*  
GPx – Glutathiona peroxidase  
GR – Glutathiona redutase  
GSF - Glutathiona  
GSSG – Glutathiona oxidada  
HSV-1 – *Herpes Simplex Virus - 1*  
HSV-2 – *Herpes Simplex Virus - 2*  
IL-1 $\beta$  – interleucina 1 $\beta$   
IL-6 – interleucina 6  
L $\cdot$  – Radical alquila  
LO $\cdot$  – Radical alcoxila  
LOO $\cdot$  – Radical peroxila  
LPS - lipopolissacarídeo  
MEM – *Minimal Essential Medium*  
NK – Células *natural killer*  
NO – Óxido nítrico  
O<sub>2</sub> $\cdot^-$  – Ânion radical superóxido  
OH $\cdot$  – Radical hidroxila  
O<sub>3</sub> – Ozônio  
ONOO $\cdot^-$  - Peroxinitrito

PBS – *Phosphate Buffered Saline*  
ROS – *Reactive oxygen species*  
SFB – Soro fetal bovino  
SNC – Sistema nervoso central  
SOD – Superóxido dismutase  
SRB – Sulforrodamina B  
TB – Transtorno Bipolar  
TFT – Teor de fenólicos totais  
TLR – *toll-like receptor*  
TNF- $\alpha$  – *Tumoral necrosis factor -  $\alpha$*   
UFP – Unidade formadora de placa  
UV – Ultra violeta  
VC – Viabilidade celular



## SUMÁRIO

<b>APRESENTAÇÃO</b> .....	<b>23</b>
<b>CAPITULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	<b>25</b>
1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS.....	25
1.2 FRUTOS VERMELHOS .....	25
<b>1.2.1 Gênero <i>Eugenia</i></b> .....	<b>27</b>
1.2.1.1 <i>Eugenia uniflora</i> L. ....	27
1.2.1.1.1 <i>Composição química</i> .....	28
1.2.1.1.2 <i>Atividades farmacológicas</i> .....	31
<b>1.2.2 Gênero <i>Fragaria</i></b> .....	<b>31</b>
1.2.2.1 <i>Fragaria x ananassa</i> Duch.....	31
1.2.2.1.1 <i>Composição química</i> .....	32
1.2.2.1.2 <i>Atividades farmacológicas</i> .....	38
<b>1.2.3 Gênero <i>Psidium</i></b> .....	<b>38</b>
1.2.3.1 <i>Psidium cattleianum</i> Sabine .....	38
1.2.3.1.1 <i>Composição química</i> .....	39
1.2.3.1.2 <i>Atividades farmacológicas</i> .....	42
<b>1.2.4 Gênero <i>Rubus</i></b> .....	<b>42</b>
1.2.4.1 <i>Composição química</i> .....	43
1.2.4.2 <i>Atividades farmacológicas</i> .....	46
<b>1.2.5 Gênero <i>Vaccinium</i></b> .....	<b>46</b>
1.2.5.1 <i>Vaccinium virgatum</i> L. ....	46
1.2.5.1.1 <i>Composição química</i> .....	47
1.2.5.1.2 <i>Atividades farmacológicas</i> .....	51
1.3 ANTOCIANINAS.....	51
1.4 ESTRESSE OXIDATIVO .....	56
1.5 CÂNCER.....	57
1.6 HERPESVÍRUS.....	58
1.7 TRANSTORNO BIPOLAR.....	59
1.8 NEUROINFLAMAÇÃO .....	61
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>63</b>
<b>CAPITULO 2 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS POTENCIAIS ATIVIDADES DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS LIVRES, CITOTÓXICA E ANTIVIRAL DE FRUTOS VERMELHOS CULTIVADOS NO SUL DO BRASIL</b> .....	<b>87</b>
2.1 INTRODUÇÃO .....	87
2.2 OBJETIVOS .....	87
2.2.1 Objetivo geral .....	87
2.2.2 Objetivos específicos .....	88

2.3 PUBLICAÇÃO - BERRIES GROWN IN BRAZIL: ANTHOCYANINS PROFILES AND BIOLOGICAL PROPERTIES	89
<b>Antiherpes screening</b> .....	<b>94</b>
<b>CAPITULO 3 - EFEITOS PREVENTIVOS DO EXTRATO DA AMORA-PRETA (<i>Rubus</i> sp.) SOBRE DISFUNÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS EM RATOS SUBMETIDOS A MODELO DE MANIA INDUZIDO POR CETAMINA</b> .....	<b>112</b>
3.1 INTRODUÇÃO .....	113
3.2 OBJETIVOS .....	113
3.2.1 Objetivo geral .....	113
3.2.2 Objetivos específicos .....	114
3.3 PUBLICAÇÃO - ANTHOCYANINS ARE AN EFFECTIVE AGENT IN THE PREVENTION OF BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL DYSFUNCTIONS OBSERVED IN RATS SUBMITTED TO A KETAMINE-INDUCED MODEL OF MANIA	115
<b>CAPITULO 4 – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO EXTRATO DA AMORA-PRETA (<i>Rubus</i> sp.) EM PREVENIR O PROCESSO DE NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO, EM MODELO ANIMAL</b> .....	<b>144</b>
4.1 INTRODUÇÃO .....	145
4.2 OBJETIVOS .....	145
4.2.1 Objetivo geral .....	145
4.2.2 Objetivos específicos .....	146
4.3 METODOLOGIA .....	146
4.3.1 Protocolo experimental do modelo de neuroinflamação e tratamento com extrato de amora-preta .....	146
4.3.2 Preparação do tecido cerebral e soro.....	146
4.3.3 Determinação de proteínas .....	147
4.3.4 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	147
4.3.5 Conteúdo tiólico total .....	147
4.3.6 Medida de espécies reativas de oxigênio.....	147
4.3.7 Atividade da superóxido dismutase .....	148
4.3.8 Atividade da catalase .....	148
4.3.9 Atividade da glutathione peroxidase .....	148
4.3.10 Teor de nitrito.....	148
4.3.11 Análise de citocinas.....	149
4.3.12 Análise estatística .....	149
4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	149

4.4.1 Parâmetros de estresse oxidativo no córtex cerebral de camundongos .....	150
4.4.2 Parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo de camundongos .....	153
4.4.3 Parâmetros de estresse oxidativo no estriado de camundongos .....	155
4.5 CONCLUSÃO .....	158
REFERÊNCIAS .....	159
5. DISCUSSÃO GERAL .....	163
6. CONCLUSÕES GERAIS .....	165
REFERÊNCIAS .....	167
APÊNDICE .....	169



## APRESENTAÇÃO

O uso de produtos naturais com finalidades medicinais ao longo da história denota a relevância dos mesmos no tratamento ou prevenção de diversas doenças. Documentos históricos relataram o uso de produtos naturais desde os anos 2600 a.C. Nos dias atuais, as plantas medicinais continuam sendo amplamente empregadas na medicina popular, mas também servem como fonte para a obtenção e o desenvolvimento de novos fármacos (BRAGA; RATES; SIMÕES, 2017; BERNARDES; LANG; PETROVICK; SCKENKEL, 2017). Neste contexto, o estudo realizado por Newman e Cragg (2016) demonstrou que, entre os anos de 1981 e 2014, mais de 50% dos novos medicamentos aprovados para uso pela agência regulatória norte-americana FDA são derivados de produtos naturais. Dentre eles podemos citar alguns amplamente usados na terapêutica, tais como taxol, morfina, vincristina, digoxina, efedrina entre outros (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Outro enfoque dado aos produtos naturais diz respeito à alimentação, a qual vem sendo discutida, nas últimas décadas, como uma importante fonte de prevenção de doenças. Estudos têm demonstrado a relação entre alimentação e saúde, o que tem instigado pesquisas com a finalidade de descobrir os principais componentes bioativos envolvidos nesses processos (YILDIZ; EYDURAN, 2009; KAUR; DAS, 2011). Como resultado deste crescente número de investigações, o termo alimento funcional foi criado para designar alimentos capazes de exercer funções de prevenção e/ou tratamento de doenças, além de suas funções nutricionais básicas, sendo as atividades farmacológicas vinculadas, principalmente, aos metabólitos primários e secundários presentes nos vegetais (FOGLIANO; VITAGLIONE, 2005; YILDIZ; EYDURAN, 2009; KAUR; DAS, 2011; SCHIEBER, 2012; ALUKO, 2016).

Nas últimas décadas, a alimentação vem sendo uma das principais formas utilizadas pela população como ferramenta auxiliar para a manutenção da saúde. Os alimentos são responsáveis, não apenas pela nutrição básica, mas também pela manutenção da qualidade de vida, visto que, muitas vezes são capazes de prevenir doenças consideradas crônicas. Sendo assim, os alimentos classificados como funcionais têm obtido destaque, visto que apresentam como característica a capacidade de prevenir certas patologias, além de suprir as necessidades nutricionais básicas (RODRIGUES et al., 2012).

Dessa ampla gama de alimentos classificados como funcionais, os frutos vermelhos têm se destacado, em função do grande número de investigações científicas realizadas nos últimos anos (ABE, 2015; GUL;

SINGH; JABEEN, 2016; WILSON et al., 2017; HEGELE; HUNTER, 2017).

No presente trabalho será dada ênfase a duas espécies de frutos vermelhos nativos do Brasil: *Eugenia uniflora* L. (Pitanga) e *Psidium cattleianum* S. (Araçá); e mais três espécies que tiveram seu cultivo introduzido no país: *Fragaria x ananassa* Duch. (Morango), *Rubus* sp. (Amora-preta) e *Vaccinium virgatum* L. (Mirtilo).

Os capítulos a seguir descreverão a investigação química dos frutos estudados, com destaque para os compostos antociânicos, bem como a avaliação das potenciais atividades antioxidante, antiviral e citotóxica *in vitro*. Além disso, a avaliação do extrato da amora-preta, em modelo animal de mania induzido por cetamina, assim como a verificação da potencial atividade anti-inflamatória, em modelo animal de neuroinflamação induzida por lipopolissacarídeo (LPS) de *Escherichia coli*.

Considerando as informações acima citadas, a presente tese está assim organizada:

O primeiro capítulo apresenta a revisão da literatura abordando os temas principais investigados na presente tese, contendo a revisão das espécies vegetais estudadas, tais como características morfológicas, composição química e potencial farmacológico. O capítulo ainda abrange uma breve descrição de compostos antociânicos e suas potenciais atividades antiviral e citotóxica, além de um tópico contextualizando o estresse oxidativo. Da mesma forma, foram brevemente abordados os temas do transtorno bipolar e da neuroinflamação.

Na sequência, o capítulo 2 contempla o preparo e caracterização química dos extratos dos frutos estudados, bem como a avaliação do seu potencial de captação de radicais livres, e das ações citotóxica e antiviral *in vitro*. O capítulo 3 apresenta a avaliação da potencial capacidade do extrato da amora-preta de prevenir episódios de mania, em modelo animal de mania induzida por cetamina.

O último capítulo exibe a avaliação da potencial capacidade anti-inflamatória e antioxidante do extrato da amora-preta, em modelo animal de neuroinflamação induzida por LPS.

Finalmente, são apresentadas as considerações finais e conclusões gerais da tese.

## CAPITULO 1 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O crescente interesse por uma alimentação saudável fez com que o termo alimento funcional se destacasse no cenário internacional. Esse conceito foi criado pela indústria alimentícia, no Japão, na década de 1980 (KHAN, et al., 2013), sendo que, atualmente, existem diferentes definições para alimentos funcionais, embora a descrita pelo *International Life Sciences Institute* seja a mais empregada. Esta definição preconiza que para um alimento ser considerado funcional, o mesmo deve desempenhar funções benéficas ao organismo, promovendo saúde, além de exercer seu papel nutricional básico. Além dessa terminologia, existem outras também empregadas com o intuito de qualificar diversos alimentos. Dentre essas, podemos citar os nutracêuticos e os suplementos alimentares, conceituados na sua essência, de forma semelhante aos alimentos funcionais (RODRIGUES, et al., 2012)

A definição de alimentos funcionais pode ser dividida em quatro grupos gerais: no primeiro, estão inseridos os alimentos naturalmente ricos em compostos biologicamente ativos, como farelo de aveia e psyllium. O segundo grupo inclui alimentos, cuja composição química é conhecida, porém não apresentam confirmação de efeitos benéficos à saúde, dos quais podemos citar o alho e ácidos graxos encontrados em peixes. No grupo três, estão contidos alimentos que foram enriquecidos com compostos associados à prevenção ou tratamento de alguma patologia, tais como suco de laranja e arroz enriquecidos com cálcio, com o objetivo de prevenir a osteoporose. No último grupo, encontram-se os alimentos integrais, os quais apresentam correlação com a redução dos riscos de doenças gastrointestinais, como produtos lácteos fermentados (KHAN, et al., 2013).

### 1.2 FRUTOS VERMELHOS

Os frutos vermelhos, de modo geral, estão inseridos no grupo dos alimentos funcionais, classificados nos grupos um e dois da classificação citada anteriormente. Apesar de não terem sido realizados estudos em humanos para comprovar sua eficácia, a composição química da grande maioria destes frutos é bem conhecida, o que poderia justificar o seu enquadramento no grupo dos alimentos funcionais (RODRIGUES, et al., 2012).

No contexto de frutos como alimentos funcionais, os frutos vermelhos destacam-se, pois são altamente apreciados, devido, primeiramente, à sua coloração, textura e sabor delicado. Porém, a principal característica que confere tal destaque é a composição química, principalmente, os metabólitos secundários, representados pelos compostos fenólicos, e mais predominantemente, as antocianinas (YILDIZ; EYDURAN, 2009; DONNO, et al., 2016).

Muitas são as definições para a classificação de frutos vermelhos, as quais diferem, principalmente, em relação às características botânicas e nomenclatura utilizada pelos consumidores. No entanto, um aspecto unânime para agrupar essa classe de frutos é a presença de compostos antociânicos, os quais são responsáveis pela sua coloração característica, variando, principalmente, entre vermelho, azul e roxo (JOSEPH; EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2014).

Os compostos fenólicos são os principais metabólitos secundários encontrados nesses frutos, especialmente ácidos fenólicos, proantocianidinas, antocianinas e outros flavonoides (FOLMER, et al., 2014). Diversas atividades farmacológicas já foram relatadas para extratos ricos em compostos antociânicos ou mesmo antocianinas isoladas, dentre as quais podemos citar atividade anti-inflamatória (JOSINO SOARES, et al., 2014; CARVALHO, et al., 2016); atividade antitumoral (STONER, et al., 1999; CARLTON, et al., 2001); atividade antioxidante (ALVAREZ-SUAREZ et al., 2011); potencial redução do risco de obesidade, diabetes tipo 2 e síndrome metabólica (ECKEL; GRUNDY; ZIMMET, 2005; BALKAU et al., 2007), atividade antiviral (CARVALHO, et al., 2012), e atividade anti maníaca em modelos animais de mania (GAZAL, et al., 2015; DEBOM, et al., 2016).

O número de espécies classificadas como frutos vermelhos é extenso, sendo que muitas delas são nativas do Brasil, enquanto outras foram introduzidas e são cultivadas no país. Espécies nativas, ainda em condições selvagens, apresentam potencial promissor no âmbito da busca por novas atividades farmacológicas, visto que ainda são pouco exploradas do ponto de vista científico. Por outro lado, Li e colaboradores (2016) demonstraram que espécies nativas, após domesticação, acabam sofrendo redução de suas potenciais atividades farmacológicas, o que poderia estar relacionado à alteração do local e das condições de cultivo.

A seguir serão descritas algumas características dos frutos vermelhos investigados na presente Tese.



### 1.2.1 Gênero *Eugenia*

O gênero *Eugenia* pertence à família Myrtaceae e possui mais de 500 espécies distribuídas na América do Sul, mais especificamente no Brasil, Argentina, Paraguai e Uruguai (FISHER; HOLLENBERG, 2005; FIUZA, et al., 2008). As espécies desse gênero são classificadas morfológicamente como árvores ou arbustos, e seus frutos geralmente são esféricos e comestíveis (AURICCHIO; BACCHI, 2003). Dentre elas, a espécie mais popular é *Eugenia uniflora* L., vulgarmente chamada de pitangueira (FISHER; HOLLENBERG, 2005).

#### 1.2.1.1 *Eugenia uniflora* L.

A pitangueira é um arbusto denso, com dois a quatro metros de altura. Os frutos são bagas globosas, medindo de 1,5 a 5 cm de diâmetro, apresentando coloração que varia de acordo com o processo de maturação, oscilando entre verde e vermelho-escuro (Figura 1). A coloração característica foi base para a origem do seu nome popular, em Tupi *ybápytanga* (*ybá* = fruto, *pytanga* = avermelhado). Sua ocorrência no Brasil é ampla, sendo encontrada desde a Bahia até o Rio Grande do Sul (BOURSCHEID, et al., 2011).

Figura 1 – Frutos de *Eugenia uniflora*



Fonte: Franzon, et al., 2013

Os frutos são as partes mais utilizadas, principalmente, na culinária. Geralmente, são consumidos produtos processados dos frutos, tais como sucos, sorvetes e geleias, visto que o consumo *in natura* é

reduzido, pois os frutos são frágeis e altamente perecíveis. A produção em escala industrial de pitangas no Brasil está localizada, principalmente, em Pernambuco, com cerca de 300 ha de cultivo. Apesar de não existirem dados oficiais, especula-se que o Brasil seja seu maior produtor mundial (BOURSCHEID, et al., 2011).

#### *1.2.1.1.1 Composição química*

Estudos sobre a composição química dos frutos de pitanga são escassos. Os estudos publicados relataram a presença de carotenoides (AZEVEDO-MELEIRO; RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; PORCU; RODRIGUEZ-AMAYA, 2008), óleos essenciais (OGUNWANDE, et al., 2005; OLIVEIRA, et al., 2006; SOARES, et al., 2015), além de compostos fenólicos, sendo que no Quadro 1 estão resumidos os dados dos principais compostos fenólicos descritos para frutos de *Eugenia uniflora* L..

Quadro 1 - Principais compostos fenólicos presentes em frutos de *Eugenia uniflora* L.

Classe	Compostos	Referências
Antocianinas	Cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	EINBOND, et al. (2004); CELLI; PEREIRA-NETTO; BETA (2011); DENARDIN, et al. (2015); SOARES, et al. (2015)
	Delfinidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	EINBOND, et al. (2004)
	Cianidina (e derivados)	DENARDIN, et al. (2015)
	Malvidina (e derivados)	
	Ácido gálico (e derivados)	
Compostos fenólicos simples	Ácidos gálico e cafeico	MASSARIOLI, et al. (2013)
	Ácido gálico (e derivados)	DENARDIN, et al. (2015)
	Ácido elágico	OLIVEIRA, et al. (2014)

Conclusão Quadro 1 - Principais compostos fenólicos presentes em frutos de *Eugenia uniflora* L.

Classe	Compostos	Referências
Flavonoides	Mirecetina (e derivados)	HOFFMANN-RIBANI; HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA (2009); CELLI; PEREIRA-NETTO; BETA (2011)
	Quercetina,	DENARDIN, et al. (2015)
	Quercetina-3-glicosídeo	
	Quercetina-3-ramnosídeo	
	Quercetina-3-galactosídeo	MASSARIOLI, et al. (2013)
	Quercetina (e derivados)	HOFFMANN-RIBANI; HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA (2009); CELLI; PEREIRA-NETTO; BETA (2011); DENARDIN, et al. (2015)
	Canferol (e derivados)	HOFFMANN-RIBANI; HUBER; RODRIGUEZ-AMAYA (2009); DENARDIN, et al. (2015); OLIVEIRA, et al. (2014)
	Quercetrina	OLIVEIRA, et al. (2014)
Luteolina	GRIFFIS, et al. (2012)	

### 1.2.1.1.2 Atividades farmacológicas

Dentre as atividades farmacológicas descritas para a pitanga, pode-se citar as atividades citotóxica em células tumorais PC-3 (carcinoma prostático humano) e Hep G2 (hepatocarcinoma humano) (OGUNWANDE, et al., 2005), antibacteriana frente a *Staphylococcus aureus* (OGUNWANDE, et al., 2005; JOVITO, et al., 2011; SANTOS, et al., 2015) e capacidade de captação de radicais livres (OLIVEIRA, et al., 2017; EINBOND, et al., 2004; APARECIDA DE ASSIS, et al., 2009; BAGETTI, et al., 2009; MASSARIOLI, et al., 2013; DENARDIN, et al., 2015).

### 1.2.2 Gênero *Fragaria*

O gênero *Fragaria* pertence à família Rosaceae sendo representado por 24 espécies distribuídas na América do Norte, América do Sul, Europa e norte da Ásia (STAUDT, 1999; MOHAMED; JEÇZ; KORBIN, 2014). De modo geral, os pseudofrutos são caracterizados por um receptáculo carnoso de coloração vermelha. As espécies *F. vesca* e *F. x ananassa* são as mais representativas do gênero, conhecidas, respectivamente, como morangueiro-silvestre e morangueiro (MOHAMED; JEÇZ; KORBIN, 2014).

#### 1.2.2.1 *Fragaria x ananassa* Duch.

*Fragaria x ananassa* Duch. é um híbrido do cruzamento espontâneo das espécies, *Fragaria chiloensis* e *Fragaria virginiana*. O morangueiro caracteriza-se por ser uma planta perene, mas cultivada como anual devido às adaptações de cultivo. Os pseudofrutos, popularmente conhecidos como frutos, são oriundos do crescimento do receptáculo das flores, enquanto os frutos verdadeiros são aquênios, popularmente conhecidos como sementes (Figura 2) (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2007).

Figura 2 – Frutos de *Fragaria x ananassa*

Fonte: Timm, et al. (2009)

A abrangência do cultivo de *F. x ananassa* é mundial, sendo seus principais produtores os Estados Unidos da América, Espanha, Coreia do Sul, Rússia, Polônia, Japão e Turquia, com uma produção anual estimada em mais de 4,5 milhões de toneladas (FAO, 2011). No Brasil, a partir da década de 1940, começaram as pesquisas e o cultivo; porém, somente a partir de 1960, ocorreu o desenvolvimento dos primeiros cultivares, adaptados às condições locais, aumentando assim a produtividade e a qualidade dos frutos aqui produzidos. Os cultivares foram desenvolvidos com base no fotoperíodo, ou seja, adaptando o período de necessidade de luz diária a cada variedade. Dessa forma, existem disponíveis cultivares de dias curtos, neutros e longos, propiciando o cultivo dos frutos de morango em diferentes épocas do ano e diferentes regiões. Atualmente, os estados com maior produção são Minas Gerais (40%), Rio Grande do Sul (25%) e São Paulo (15%) (ANTUNES; PERES, 2013).

#### 1.2.2.1.1 Composição química

A composição química dos pseudofrutos de morango é diversa, tendo sido encontrados óleos voláteis (CANNON, et al., 2015), carotenoides (ZHU, et al., 2015) e, principalmente, compostos fenólicos, cujos principais representantes estão apresentados no (Quadro 2).

Quadro 2 - Principais compostos fenólicos presentes em pseudofrutos de *Fragaria x ananassa* Duch.

Classe	Compostos	Referências
Antocianinas	Cianidina- <i>O</i> -glicosídeo	LOPES-DA-SILVA, et al. (2002); WU, et al. (2006); SEERAM, et al. (2006); OBÓN; DÍAZ-GARCÍA; CASTELLAR (2011); DÍAZ-GARCÍA, et al. (2013); FERNÁNDEZ-LARA, et al. (2015); VEBERIC, et al. (2015)
	Pelargonidina- <i>O</i> -glicosídeo	
	Pelargonidina- <i>O</i> -rutinosídeo	LOPES-DA-SILVA, et al. (2002); WU, et al. (2006); SEERAM, et al. (2006); OBÓN; DÍAZ-GARCÍA; CASTELLAR (2011); DÍAZ-GARCÍA, et al. (2013); FERNÁNDEZ-LARA, et al. (2015)
	Cianidina- <i>O</i> -arabinosídeo	VEBERIC, et al. (2015)
	Cianidina- <i>O</i> -sambubiosídeo	VEBERIC, et al. (2015)
	Pelargonidina- <i>O</i> -galactosídeo	LOPES-DA-SILVA, et al. (2002); FERNÁNDEZ-LARA, et al. (2015); VEBERIC, et al. (2015)
	Pelargonidina- <i>O</i> -malonilglicosídeo	WU, et al. (2006); VEBERIC, et al. (2015)
	Cianidina- <i>O</i> -rutinosídeo	LOPES-DA-SILVA, et al. (2002); WU, et al. (2006); FERNÁNDEZ-LARA, et al. (2015)
	Cianidina- <i>O</i> -soforosídeo	WU, et al. (2006)
	Petunidina- <i>O</i> -glicosídeo	
	Pelargonidina- <i>O</i> -monoglicuronídeo	FERNÁNDEZ-LARA, et al. (2015)
	Cianidina- <i>O</i> -acetilglicosídeo	
Pelargonidina- <i>O</i> -acetilglicosídeo	WU, et al. (2006); FERNÁNDEZ-LARA, et al. (2015)	

Continuação Quadro 2- Principais compostos fenólicos presentes em pseudofrutos de *Fragaria x ananassa* Duch.

Classe	Compostos	Referências
Antocianinas	Pelargonidina- <i>O</i> -diglicosídeo	LOPES-DA-SILVA, et al. (2002); FERNÁNDEZ-LARA, et al. (2015)
	Catequina-pelargonidina- <i>O</i> -glicosídeo	LOPES-DA-SILVA, et al. (2002)
	Epicatequina-pelargondina- <i>O</i> -glicosídeo	
	Epiafzelequina-pelargonidina- <i>O</i> -glicosídeo	
	Epiafzelequina-pelargonidina- <i>O</i> -rutinosídeo	
	Cianidina- <i>O</i> -malonildiglicosídeo	
	Pelargonidina- <i>O</i> -malilglicosídeo	
	Pelargonidina- <i>O</i> -acetilhexosídeo+pentosídeo	
	Pelargonidina- <i>O</i> -arabinosídeo	
	Cianidina- <i>O</i> -malonilglicosídeo	
Carboxipiranopelargonidina- <i>O</i> -glicosídeo	LOPES-DA-SILVA, et al. (2002); ANDERSEN, et al. (2004)	



Continuação Quadro 2 - Principais compostos fenólicos presentes em pseudofrutos de *Fragaria x ananassa* Duch.

Classe	Compostos	Referências
Compostos fenólicos simples	Ácido hidroxibenzóico (e derivados)	AABY; EKEBERG; SKREDE (2007)
	Ácido elágico (derivado)	WOJDYLO; OSZMIANSKI; BOBER (2008); WANG; MILLINER (2009)
	Ácido elágico glicosídeo	JIN, et al.(2011)
	Ácido <i>p</i> -cumaroil glicosídeo	WOJDYLO; OSZMIANSKI; BOBER (2008); WANG; MILLINER (2009); SIMIRGIOTIS. et al. (2009); JIN. et al.(2011); KELEBEK; SELLI (2011b)
	Ácido cafeico	KELEBEK; SELLI (2011b); HUANG, et al. (2012)
	Ácido cafeico glicosídeo	KELEBEK, SELLI (2011b)
	Ácido gálico	LI, et al. (2009); HUANG, et al. (2012)
	Ácido <i>p</i> -hidrozibenzóico	KELEBEK, SELLI (2011b); HUANG, et al. (2012)
	Ácido cinâmico	LI, et al. (2009); HUANG, et al. (2012)
	Ácido cumárico	LI, et al. (2009); KELEBEK; SELLI (2011b)
	Ácido <i>p</i> -cumárico (e derivados)	BUENDIA, et al.(2010)
	Ácido elágico	HUANG, et al. (2012)
	Ácido elágico pentosídeo Ácido elágico ramnosídeo	SIMIRGIOTIS, et al. (2009)
Ácido ferúlico (e derivados)	BUENDIA, et al.(2010); KAJDZANOSKA; PETRESKA; STEFOVA (2011); KELEBEK; SELLI (2011b)	

Continuação Quadro 2 - Principais compostos fenólicos presentes em pseudofrutos de *Fragaria x ananassa* Duch.

Classe	Compostos	Referências
Flavonoides	Quercetina-3-glicosídeo	WOJDYLO; OSZMIANSKI; BOBER (2008); JIN, et al.(2011)
	Quercetina-3-glicuronídeo	WANG; MILLINER (2009); SIMIRGIOTIS, et al. (2009); BUENDIA, et al.(2010); KAJDZANOSKA; PETRESKA; STEFOVA (2011); KELEBEK; SELLI (2011b)
	Quercetina-3-pentosídeo	KELEBEK; SELLI (2011b)
	Quercetina-3-ramnosídeo	HUANG, et al. (2012)
	Metilquercetina-glicuronídeo	SIMIRGIOTIS, et al. (2009)
	Canferol-3-glicosídeo	WANG; MILLINER (2009); BUENDIA, et al.(2010); JIN, et al.(2011)
	Canferol-3-glicuronídeo	WANG; MILLINER (2009); KELEBEK; SELLI (2011b)
	Canferol-cumaril-glicosídeo	SIMIRGIOTIS, et al. (2009); BUENDIA, et al.(2010); KAJDZANOSKA; PETRESKA; STEFOVA (2011); KELEBEK; SELLI (2011b)
	Canferol-acetil-glicosídeo	KAJDZANOSKA; PETRESKA; STEFOVA (2011)

Conclusão Quadro 2 - Principais compostos fenólicos presentes em pseudofrutos de *Fragaria x ananassa* Duch.

Classe	Compostos	Referências
Taninos	Galoil-HHDP glicosídeo	AABY; EKEBERG; SKREDE (2007); BUENDIA, et al. (2010); KELEBEK; SELLI (2011b); JOSUTTIS, et al. (2013)
	Proantocianidina B1	AABY; EKEBERG; SKREDE (2007)
	Proantocianidina B3	WOJDYLO; OSZMIANSKI; BOBER (2008), AABY; EKEBERG; SKREDE (2007)
	Elagitaninos (e derivados)	SIMIRGIOTIS, et al. (2009)
	Lambertianina C	BUENDIA, et al. (2010); KELEBEK; SELLI (2011b); JOSUTTIS, et al. (2013)
	Galocatequina	HUANG, et al. (2012)
	Epigalocatequina	
	Calistegina	JOSUTTIS, et al. (2013)
Agrimonia		

### 1.2.2.1.2 Atividades farmacológicas

Muitas são as atividades farmacológicas descritas para extratos de morangos, dentre elas, pode-se citar as atividades: citotóxica para células de tecido transuretral prostático (WEAVER, et al., 2009), antiproliferativa em células Hep-G2 , HT29, HCT-116, LNCaP (MEYERS, et al., 2003; SEERAM, 2006; ZHANG, et al., 2008), citotóxica para células tumorais esofágicas de ratos (F344) (STONER, et al., 1999; CARLTON, et al., 2001), antioxidante (ALVAREZ-SUAREZ, et al., 2014), antidislipidêmica (BASU, et al., 2009; BURTON-FREEMAN, et al., 2010) e anti-HSV-1 (CARVALHO, et al., 2012), além da sua capacidade de captação de radicais livres (KÄHKÖNEN; HOPIA; HEINONEN, 2001; ZHANG, et al., 2008; LI, et al., 2009; KELEBEK; SELLI, 2011a; WANG; FAN; ZHANG, 2011; LAL, et al., 2013).

### 1.2.3 Gênero *Psidium*

O gênero *Psidium* pertence à família Myrtaceae e ocorre desde o sul do México até a Argentina (SOARES-SILVA; PROENÇA, 2008). Cerca de 100 espécies estão classificadas nesse gênero, sendo *P. guajava*, *P. guinense* e *P. cattleianum* (goiabeira, araçazeiro-do-campo e araçazeiro, respectivamente) as mais conhecidas, principalmente, pelo fato de seus frutos serem comestíveis (LANDRUM; KAWASAKI, 1997).

#### 1.2.3.1 *Psidium cattleianum* Sabine

A espécie *P. cattleianum* ocorre desde a Bahia até o Rio Grande do Sul, sendo originária do sul do país. Quando em condições nativas, tendem a produzir frutos uma vez ao ano, embora em condições de cultivo possam ser observadas frutificações bianuais (RASEIRA, 1996). Esta espécie apresenta características arbustivas ou arbóreas, e seus frutos exibem coloração, que varia do amarelo ao roxo (Figura 3) (FRAZON, et al., 2009).

Figura 3 - Frutos de *Psidium cattleianum*



Fonte: Frazon, et al. (2009).

Os frutos de *P. cattleianum*, conhecidos popularmente como araçás, apresentam crescente consumo *in natura*, ou mesmo na forma de produtos processados, tais como sucos, polpas congeladas, licores, geleias e doces (ANDRADE, et al., 2012).

#### 1.2.3.1.1 Composição química

Os trabalhos já realizados com os frutos de *P. cattleianum* S. destacaram a presença de óleos voláteis (VERNIN, et al., 1998; PINO; MARBOT; VÁZQUEZ, 2001; CHEN; LICHWA; RAY, 2007; MARQUES, et al., 2008; EGEA, et al., 2014), carotenoides (RIBEIRO, et al., 2014; SILVA, et al., 2014) e, principalmente, compostos fenólicos, os quais estão descritos no Quadro 3.

Quadro 3 - Principais compostos fenólicos presentes em frutos de *Psidium cattleianum*

Classe	Compostos	Referências
Antocianinas	Cianidina (e derivados)	BIEGELMEYER, et al. (2011)
Compostos fenólicos simples	Ácido gálico	MEDINA, et al. (2011); RIBEIRO, et al. (2014); SILVA, et al. (2014)
	Ácido cumárico	MEDINA, et al. (2011)
	Ácido ferúlico	
	Ácido clorogênico	RIBEIRO, et al. (2014)
	Ácido elágico hexosídeo	
	Ácido elágico pentosídeo	
	Ácido elágico deoxihexosídeo	
	Ácido metil-elágico deoxihexosídeo	
	Ácido metil-elágico acetil-deoxihexosídeo	
	Ácido trigaloilquínico	
	Ácido elágico	
	Cinamoil-galoil hexosídeo	
	Galoil hexosídeo	
	Digaloil hexosídeo	SILVA, et al. (2014)
	Ácido vanílico hexosídeo	
Ácido metil-elágico hexosídeo		
Ácido metil-elágico pentosídeo		

Conclusão Quadro 3 - Principais compostos fenólicos presentes em frutos de *Psidium cattleianum*.

Classe	Compostos	Referências
Flavonoides	Isoquercetrina	BIEGELMEYER, et al. (2011)
	Hiperosídeo	
	Epicatequina	MEDINA, et al. (2011)
	Mirecetina	
	Quercetina	
	Quercetina pentosídeo	RIBEIRO, et al. (2014)
	Quercetina deoxihexosídeo	
	Quercetina cumaroil deoxihexosídeo	
	Quercetina glicuroníde	
	Quercetina hexosídeo	RIBEIRO, et al. (2014); SILVA, et al. (2014)
	Quercetina-3-glicosídeo	DENARDIN, et al. (2015)
	Quercetina (e derivados)	
	Taxifolina hexosídeo	SILVA, et al. (2014)
Eriodictiol hexosídeo		
Taninos	Elagitanino (e derivados)	RIBEIRO, et al. (2014)
	Galato epicatequina	RIBEIRO, et al. (2014); SILVA, et al. (2014)
	Di-HHDP hexosídeo	
	HHDP digaloil hexosídeo	SILVA, et al. (2014)
	HHDP hexosídeo	

### 1.2.3.1.2 Atividades farmacológicas

As principais atividades farmacológicas descritas para os frutos de *P. cattleianum* são: capacidade de captação de radicais livres (LUXIMON-RAMMA; BAHORUN; CROZIER, 2003; MEDINA, et al., 2011; RIBEIRO, et al., 2014; DENARDIN, et al., 2015), e ação antiproliferativa em células MCF-7 e Caco-2 (MEDINA, et al., 2011).

### 1.2.4 Gênero *Rubus*

O gênero *Rubus* está inserido na família Rosaceae, constituído por aproximadamente 740 espécies. Os exemplares desse gênero apresentam porte ereto ou rasteiro e frutos agregados, sendo seu cultivo originário dos Estados Unidos da América. Os frutos, conhecidos como amoras-pretas têm coloração roxa, sabor variando entre ácido e doce-ácido, e com massa entre quatro a sete gramas (Figura 4) (DAUBENY, 1996).

O cultivo no Brasil teve início em 1972, na Embrapa Clima Temperado (Pelotas/RS), a partir do desenvolvimento de cultivares adaptadas ao clima da região, as quais apresentam alta produtividade (ANTUNES, 2002; ANTUNES; RASSEIRA, 2004). Sua produção tem apresentado crescimento significativo nos últimos anos, totalizando uma área de cultivo estimada em 150 ha. O Rio Grande do Sul apresenta a maior produção nacional, estendendo-se também para Minas Gerais, Rio de Janeiro e Espírito Santo (ANTUNES; TREVISAN; PEREIRA, 2007).

Figura 4 - Frutos de *Rubus* sp.



Fonte: Lazzarotto; Fioravanço, 2014



#### 1.3.4.1 Composição química

Dentre as principais classes de substâncias químicas encontradas nos frutos de amora-preta é possível citar os compostos fenólicos, os quais estão descritos no Quadro 4. Outros compostos presentes são carotenoides (MARINOVA; RIBAROVA, 2007), tocoferóis (CHUN, et al., 2006) e óleos voláteis (LI; HE; GU, 1998).

Quadro 4 - Principais compostos fenólicos presentes em frutos de *Rubus* sp.

Classe	Compostos	Referências
Antocianinas	Cianidina- <i>O</i> -glicosídeo	WU, et al. (2006); SEERAM, et al. (2006); VEBERIC, et al. (2015)
	Cianidina- <i>O</i> -xilósídeo	
	Cianidina- <i>O</i> -galactosídeo	VEBERIC, et al. (2015)
	Cianidina- <i>O</i> -arabinosídeo	FAN-CHIANG; WROLSTAD (2005); WU, et al. (2006); SEERAM, et al. (2006); VEBERIC, et al. (2015)
	Pelargonidina- <i>O</i> -glicosídeo	WU, et al. (2006); SEERAM, et al. (2006);
	Peonidina- <i>O</i> -glicosídeo	
	Cianidina- <i>O</i> -malonilglicosídeo	SEERAM, et al. (2006); VEBERIC, et al. (2015)
	Cianidina- <i>O</i> -dioxilglicosídeo	WU, et al. (2006); SEERAM, et al. (2006); VEBERIC, et al. (2015)
	Cianidina- <i>O</i> -rutinosídeo	WU, et al. (2006)
	Malvidina- <i>O</i> -glicosídeo	REYES-CARMONA, et al. (2005)
	Malvidina- <i>O</i> -acetilglicosídeo	

Conclusão Quadro 4 – Principais compostos fenólicos presentes em frutos de *Rubus* sp.

Classe	Compostos	Referências
Compostos fenólicos simples	Ácido gálico	SELLAPPAN; AKOH; KREWER (2002); SIRIWOHARN, et al. (2004)
	Ácido elágico	
	Ácido hidroxibenzóico	SELLAPPAN; AKOH; KREWER (2002)
	Ácido Cafeico	
	Ácido Cumárico	
	Ácido ferúlico	
Flavonoides	Quercetina	SIRIWOHARN, et al. (2004)
	Canferol	
	Quercetina-xilosídeo	WOJDYŁO; FIGIEL; OSZMIĄŃSKI (2009)
	Quercetina-rutinosídeo	MULLEN; LEAN; CROZIER (2002)
	Quercetina-glicosídeo	CHO et al (2005); MERTZ, et al. (2007);
	Quercetina-glicuronídeo	CHO et al (2005); MERTZ, et al. (2007)
	Quercetina-HMG-glicosídeo	CHO, et al. (2005)
Taninos	Lamberinina C	GASPEROTTI, et al. (2010);
	Sanguina H6	MERTZ, et al (2007); GASPEROTTI, et al. (2010)

#### 1.2.4.2 Atividades farmacológicas

Dentre as principais atividades farmacológicas descritas para o gênero *Rubus* destacam-se: atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus*, *Proteus* sp. e *Enterococcus faecalis* (ÇOBAN; BIYIK, 2010), capacidade de captação de radicais livres (DENARDIN, et al., 2015), anti-inflamatória em modelo de edema de pata induzido por carragenina (RAMIREZ, et al., 2011) e antiviral frente a norovírus murino e ao vírus influenza (LEE, et al., 2016a; LEE, et al., 2016b).

#### 1.2.5 Gênero *Vaccinium*

O gênero *Vaccinium* pertence à família Ericaceae e compreende cerca de 450 espécies, encontradas, principalmente, nas regiões frias do hemisfério norte (LUBY, et al., 1991). Os países da Europa, Ásia e América do Norte são os principais consumidores dos frutos desse gênero, sendo responsáveis por 90% da produção mundial. Na América do Sul, Chile e Argentina são os maiores produtores (ABREU; BARRETO; PRIETO, 2014)

No Brasil, as principais espécies cultivadas são *V. corymbosum* L. e *V. virgatum*, conhecidas como mirtilo (*blueberry*), ambas originárias da América do Norte. O cultivo no Brasil está localizado, principalmente, no Rio Grande do Sul, onde são cultivados mais de 83 ha, o que corresponde a 70% de toda área cultivada no país para a produção destes frutos (ANTUNES; PAGOT, 2016).

##### 1.3.5.1 *Vaccinium virgatum* L.

A espécie *Vaccinium virgatum* é conhecida popularmente como mirtilo, ou mais especificamente, mirtilo olho-de-coelho (*rabbit eye*) (Figura 5). Esta é a principal espécie cultivada no Brasil, especialmente por apresentar características climáticas propícias, tais como resistência ao calor e baixa necessidade de frio, além de apresentar alta produtividade, frutos firmes e elevada vida pós-colheita (ANTUNES; RASEIRA, 2008; EHLENFELDT, et al., 2012).

Figura 5 – Frutos de *Vaccinium virgatum*



Fonte: Antunes, 2016

#### *1.2.5.1.1 Composição química*

Os frutos de *Vaccinium virgatum* caracterizam-se pela presença de óleos voláteis (HORVAT, et al., 1996; SU; CHIEN, 2010), carotenoides (NAWA, et al., 1993), triterpenos (ONO, et al., 2004) e, principalmente, compostos fenólicos, os quais estão apresentados no Quadro 5.

Quadro 5 - Principais compostos fenólicos presentes em frutos de *Vaccinium virgatum*

Classe	Compostos	Referências
Antocianinas	Delfinidina-3- <i>O</i> -galactosídeo	NAKAJIMA, et al. (2004); HAMAMATSU; YABE; NAWA (2004); LOHACHOOMPOL, et al. (2008); SUN; LIN; CHEN (2012); WANG, et al. (2012a); LI; HE (2013)
	Cianidina-3- <i>O</i> -galactosídeo	
	Petunidina-3- <i>O</i> -galactosídeo	
	Cianidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	NAKAJIMA, et al. (2004); HAMAMATSU; YABE; NAWA (2004); LOHACHOOMPOL, et al. (2008); WANG (2012); HE (2016)
	Delfinidina-3- <i>O</i> -arabinosídeo	NAKAJIMA, et al. (2004); HAMAMATSU; YABE; NAWA (2004); LOHACHOOMPOL, et al. (2008); SUN, LIN; CHEN (2012); WANG, et al. (2012); HE, et al. (2016)
	Cianidina-3- <i>O</i> -arabinosídeo	NAKAJIMA, et al. (2004); HAMAMATSU, YABE; NAWA (2004); LOHACHOOMPOL, et al. (2008); SUN; LIN; CHEN (2012); HE, et al. (2016)
	Delfinidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	NAKAJIMA, et al. (2004); SUN; LIN; CHEN (2012); HAMAMATSU; YABE; NAWA (2004); LOHACHOOMPOL, et al. (2008); WANG, et al. (2012); LI; HE (2013); HE, et al. (2016)
	Petunidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	
	Malvidina-3- <i>O</i> -arabinosídeo	
	Peonidina-3- <i>O</i> -galactosídeo	

Continuação Quadro 5 – Principais compostos fenólicos presentes em frutos de *Vaccinium virgatum*.

Classe	Compostos	Referências
Antocianinas	Petunidina-3- <i>O</i> -arabinosídeo	NAKAJIMA, et al. (2004); HAMAMATSU; YABE; NAWA (2004); LOHACHOOMPOL, et al. (2008); SUN; LIN; CHEN (2012); WANG, et al. (2012)
	Peonidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	
	Peonidina-3- <i>O</i> -arabinosídeo	NAKAJIMA, et al. (2004); HAMAMATSU, YABE; NAWA (2004); LOHACHOOMPOL, et al. (2008);
	Malvidina-3- <i>O</i> -galactosídeo	HAMAMATSU; YABE; NAWA (2004); LOHACHOOMPOL, et al. (2008); WANG (2012); HUANG, et al. (2012); SUN; LIN; CHEN (2012); LI; HE (2013)
	Malvidina-3- <i>O</i> -glicosídeo	HAMAMATSU, YABE; NAWA (2004); LOHACHOOMPOL, et al. (2008); HUANG, et al. (2012); SUN; LIN; CHEN (2012); WANG, et al. (2012); LI; HE (2013); HE, et al. (2016)
	Cianidina-acetilhexosídeo	HAMAMATSU; YABE; NAWA (2004)
Ácidos fenólicos simples	Vaccihenina	ONO, et al. (2002)
	Ácido clorogênico	WANG, et al. (2012)
	Ácido <i>p</i> -hidroxibenzóico	HUANG, et al. (2012)
	Ácido vanílico	
	Ácido cafeico	
	Ácido ferúlico	

Conclusão Quadro 5 – Principais compostos fenólicos presentes em frutos de *Vaccinium virgatum*.

Classe	Compostos	Referências
Flavonoides	Syringetina-3-O-ramnosídeo	ONO, et al. (2002)
	Mirecetina-3-arabinosídeo	WANG, et al. (2012)
	Quercetina-3-galactosídeo	
	Quercetina-3-glicosídeo	
	Quercetina-3-ramnosídeo	HUANG, et al. (2012)
	Quercetina	
	Rutina	
Miricetina		
Estilbenos	Pterostilbeno	RIMANDO, et al. (2004)
	Resveratrol	RIMANDO, et al. (2004); WANG, et al. (2012)
Taninos	Galocatequina	HUANG, et al. (2012)



### 1.2.5.1.2 Atividades farmacológicas

As principais atividades farmacológicas descritas na literatura para os frutos de *V. virgatum* são sua capacidade de captação de radicais livres (SU; CHIEN; 2007; SPAGOLLA, et al., 2009; WANG; CHEN; EHLENFELDT, 2011a, 2011b; WANG; CAMP; EHLENFELDT, 2012; WANG, et al., 2012b; LI, et al., 2013; VIZZOTTO, et al., 2013; PARK, et al., 2014) e ação antinociceptiva (RAMIREZ, et al., 2010).

## 1.3 ANTOCIANINAS

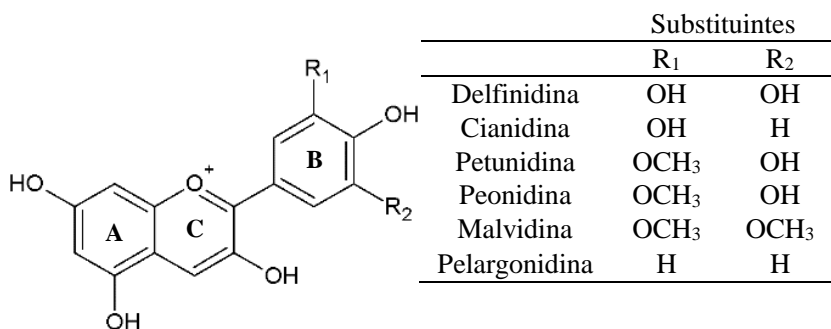
O termo antocianina é originário do grego, onde *anthos* e *kianos* significam flor e azul, respectivamente. Esse termo foi criado pelo farmacêutico alemão Ludwig Marquat, em 1835, para denominar pigmentos azuis existentes em flores de *Centaurea cyanus*. Porém, somente em 1913, Willstatter e Everest realizaram a identificação da primeira antocianina a partir de flores de *C. cyanus* (BUENO, et al., 2012a; 2012b).

As antocianinas apresentam características hidrossolúveis e estão presentes em flores e frutos, mas podem ser encontrados em folhas, troncos e raízes com menor frequência (BUENO, et al., 2012b). O papel desses compostos na fisiologia vegetal é de extrema importância, pois são responsáveis pela atração de polinizadores e, por consequência, pela dispersão das sementes (WU, et al., 2006). A localização nas células vegetais é restrita a vacúolos de células epidermais, com algumas exceções, onde é possível encontrá-las em organelas especializadas, denominadas antocianoplastos (DE PASCUAL-TERESA; SANCHEZ-BALLESTA, 2008).

As antocianinas são encontradas na natureza, principalmente, na forma de heterosídeos, os quais são formados por uma aglicona, denominada antocianidina, que possui como estrutura básica o núcleo 2-fenilbenzopirilo, o qual é formado por um anel aromático (A) ligado a um anel heterocíclico (C) que, por sua vez, está ligado a um terceiro anel aromático (B). A estrutura apresenta-se, quando em sua forma mais estável, na forma de um cátion, denominado cátion flavílio (Figura 6). Devido à essa estrutura característica das antocianinas, a presença de um cromóforo com oito ligações duplas conjugadas gera um máximo de absorção na região visível (490 a 550 nm) do espectro, além de apresentar absorção na região ultravioleta entre 270 e 280 nm (GIUSTI; WROLSTAD, 2005; HE; GIUSTI, 2010).

As antocianidinas, agliconas das antocianinas, raramente são encontradas na natureza, pois apresentam baixa estabilidade, o que é explicado pela ausência de açúcares na estrutura, responsáveis pela formação de ligações de hidrogênio intramoleculares (HE; GIUSTI, 2010; BUENO, et al., 2012b). Grupos hidroxila e/ou metoxila, presentes em diferentes número e posições nas antocianidinas, são os responsáveis pela diversidade de estruturas encontradas na natureza. Já foram descritas mais de 30 antocianidinas, sendo cianidina (31%), delphinidina (12%), pelargonidina (12%), peonidina (12%), petunidina (7%) e malvidina (7%) as mais comumente encontradas na natureza (ANDERSEN; MARKHAM, 2006; DEL RIO; BORGES; CROZIER, 2010) (Figura 6).

Figura 6 - Cátion flavílio e principais antocianidinas



A classificação das antocianinas, além de estar baseada nas agliconas, também é resultante da natureza dos diferentes açúcares ligados, e aos distintos ácidos esterificados à molécula. Os açúcares estão frequentemente ligados por meio de ligações *O*-heterosídicas, porém existem raros relatos de ligações *C*-heterosídicas (BUENO, et al., 2012b). Assim como os açúcares, os ácidos orgânicos também podem estar acoplados aos resíduos de açúcar por meio de uma *O*-acilação (GAO; MAZZA, 1994).

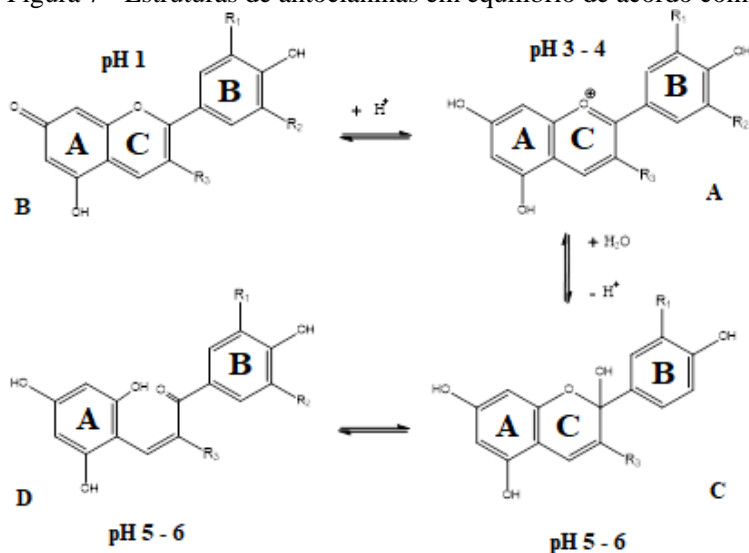
Geralmente, as antocianinas possuem um ou mais açúcares ligados à aglicona, resultando em moléculas com massas moleculares variando de 400 a 1.200 Da. Os principais açúcares presentes nas moléculas de antocianinas são: glicose, galactose, rarnnose, arabinose e xilose (PEREIRA, et al., 2009). Frequentemente, esses substituintes são encontrados como monoglicosídeos ligados na posição 3 da aglicona,

embora seja possível encontrar, em menor frequência, diglicosídeos e triglicosídeos ligados nas posições 3, 5 e 7 da aglicona. Entre os diglicosídeos, os mais abundantes são: rutinose, sambubiose, latirose e laminariobiose (DE PASCUAL-TERESA; SANCHEZ-BALLESTA, 2008; SMERIGLIO et al., 2016).

A *O*-acilação com ácidos orgânicos é relatada em mais de 60% das antocianinas, sendo importante para a estabilidade dessas moléculas. Apesar disso, as antocianinas presentes nos frutos vermelhos não apresentam, na sua maioria, resíduos de açúcar acilados. Os ácidos orgânicos mais frequentemente esterificados são: cafeico, ferúlico, sinápico, *p*-cumárico e 3,5 dihidroxicinâmico. Além desses, ácidos alifáticos também podem ocorrer, tais como acético, málico, malônico, oxálico, succínico e tartárico. A ocorrência simultânea de até três ácidos na mesma molécula já foi relatada, sendo que o ácido malônico é encontrado em torno de 25% das antocianinas aciladas (CASTAÑEDA-OVANDO, et al., 2009; ZHAO, et al., 2017).

Diferentemente dos demais flavonoides, as antocianinas apresentam características peculiares em função do pH do meio, visto que elas podem se rearranjar estruturalmente e, ainda, realizar um deslocamento de elétrons com consequente formação de estruturas com ressonância (PRIOR; WU, 2006; ZAFRA-STONE, et al., 2007; DEL RIO; BORGES; CROZIER, 2010). Sendo assim, em pH 1 as antocianinas irão apresentar a forma de cátion flavílio (Figura 7A), com predomínio da cor vermelha. Com o aumento do pH, oscilando entre 3 e 4, a estrutura predominante será uma base quinoidal (Figura 7B), com coloração que varia do azul ao violeta. Em pH entre 5 e 6, duas estruturas incolores podem ser encontradas, um carbinol pseudobase (Figura 7C) e uma chalcona (Figura 7D). Em meio alcalino, as antocianinas tendem a sofrer degradação, ocasionando a ruptura do anel C, formando assim um ácido fenólico e um aldeído. Soluções com pH entre 4 e 6 propiciam a coexistência das quatro formas estruturais mencionadas (HE; GIUSTI, 2010).

Figura 7 - Estruturas de antocianinas em equilíbrio de acordo com o pH



Fonte: Adaptado de Giusti; Wrolstad (2005).

A estabilidade dos compostos antocianínicos está relacionada a diversos fatores, mas principalmente com as características estruturais da molécula. A presença de substituintes no anel B, geralmente grupos hidroxilas e metoxilas, tendem a diminuir a estabilidade da molécula em pH neutro, fato que justifica a maior estabilidade da pelargonidina, enquanto que a presença de açúcares ligados a aglicona aumenta a estabilidade. Sendo assim, o número de açúcares é proporcional à estabilidade do composto, principalmente, em condições que tendem a neutralidade (FLESCHHUT, et al., 2006; CASTAÑEDA-OVANDO, et al., 2009). Além disso, outros fatores externos, tais como pH do meio, temperatura, ação de enzimas, exposição à luz e presença de outros compostos, como por exemplo flavonoides e íons metálicos, podem interferir na estabilidade das antocianinas (AMR; AL-TAMIMI, 2007; CASTAÑEDA-OVANDO, et al., 2009; CAVALCANTI; SANTOS; MEIRELES, 2011).

A estabilidade da coloração é outro aspecto afetado pela presença de diferentes compostos no meio. Esse processo de estabilização da cor é chamado de copigmentação e acontece por meio de interações entre as antocianinas e outras moléculas orgânicas, que, geralmente, não

apresentam coloração ou podem ocorrer entre as próprias antocianinas (BOULTON, 2001).

O mecanismo de copigmentação ocorre de forma espontânea, e ocasiona um efeito batocrômico no espectro de absorção, ou seja, induzindo um deslocamento de 5 a 20 nm, além de um efeito hiperacrômico, no qual ocorre um aumento na intensidade da coloração das antocianinas. Dentre as moléculas que podem atuar como copigmentos, podemos citar flavonoides, alcaloides, aminoácidos, ácidos orgânicos, nucleotídeos, polissacarídeos, metais e outras antocianinas (BOULTON, 2001; CAVALCANTI; SANTOS; MEIRELES, 2011).

De forma geral, o fenômeno de copigmentação é dividido em intramolecular e intermolecular, e pode ser classificado de quatro formas específicas, dependendo do copigmento e da interação. Primeiramente, a copigmentação pode ocorrer com outra antocianina, ou ainda como uma copigmentação intramolecular, principalmente, se a molécula estiver acilada com um ácido orgânico. Um terceiro mecanismo é quando existe interação com um íon metálico, e a quarta possibilidade é quando ocorre a ligação de copigmentos que possuam um par de elétrons livres (copigmentação intermolecular) (BUENO, et al., 2012b; ESCRIBANO-BAILÓN; SANTOS-BUELGA, 2012).

A copigmentação intramolecular é mais eficiente que a intermolecular, pois, principalmente em antocianinas aciladas, a copigmentação intramolecular induz proteção da aglicona frente ao ataque nucleofílico de moléculas de água na posição 2 do anel C (BUENO et al., 2012b; ESCRIBANO-BAILÓN; SANTOS-BUELGA, 2012). Já no processo de copigmentação intermolecular, ocorre a formação de um complexo no anel B do cátion flavílio, especialmente quando estiverem presentes dois grupamentos hidroxila em posição *orto*, característica essa encontrada nas agliconas: cianidina, delfinidina e petunidina (ESCRIBANO-BAILÓN; SANTOS-BUELGA, 2012).

Como resultado dos processos de copigmentação, surgem dois efeitos gerais: formação de um complexo de ligações  $\pi$ - $\pi$ , o qual causa alterações nas propriedades do cátion flavílio, causando efeitos batocrômico e hiperacrômico, e a formação de um complexo  $\pi$  realizando a estabilização do cátion flavílio, e consequente efeito hiperacrômico (BOULTON, 2001).

As diferentes colorações existentes em antocianinas são resultantes de combinações, que abrangem vermelho, violeta, roxo e azul. Os principais fatores que determinam a cor resultante de vegetais ricos em antocianinas são estrutura, pH, temperatura e presença de copigmentos (TANAKA; BRUGLIERA; CHANDLER, 2009).

Em relação à estrutura, a presença de grupamentos hidroxilas no anel B faz com que a coloração azulada seja intensificada, assim como a presença de ácidos orgânicos aromáticos acilados. A glicosilação contribui para a coloração avermelhada na tonalidade final. A presença dos íons metálicos Al, Fe, Cu, Sn, Mg e Mo como copigmentos estimula a produção da cor azul (STARR; FRANCIS, 1973; BOULTON, 2001).

Os compostos antocianicos são abordados na literatura, de modo geral, levando em consideração dois aspectos: o primeiro, relacionado ao fato de apresentarem coloração intensa, sendo que as antocianinas juntamente com os carotenoides e as betalainas, são os pigmentos naturais mais utilizados na indústria alimentícia como alternativas aos corantes sintéticos (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). Outro aspecto, diz respeito à ingestão de alimentos ricos em antocianinas, devido às propriedades farmacológicas a elas associadas.

Diversas são as atividades farmacológicas já descritas para as antocianinas, dentre as quais pode-se citar: antioxidante (KÄHKÖNEN; HOPIA; HEINONEN, 2001; YILDIZ; EYDURAN, 2009), anticarcinogênica (LIU, et al., 2005; YEH; YEN, 2005; TULIPANI; MEZZETTI; BATTINO, 2009), antiviral (KNOX, et al., 2003; SUZUTANI, et al., 2003; CARVALHO, et al., 2012), neuroprotetora (SHUKITT-HALE; CHENG; JOSEPH, 2009; KRIKORIAN, et al., 2010a; 2010b), redução do colesterol (CASTILLA, et al., 2008; ERLUND, et al., 2008; GUPTA; SODHI; MAHAJAN, 2009), controle da obesidade (TSUDA, et al., 2003; PENG, et al., 2011), controle da diabetes (PRIOR, et al., 2008; DEFURIA, et al., 2009; GRACE, et al., 2009; TAKIKAWA, et al., 2010) e prevenção de doenças cardiovasculares (RISSANEN, et al., 2003; ELLINGSEN, et al., 2008; BASU, et al., 2010).

#### 1.4 ESTRESSE OXIDATIVO

O estresse oxidativo pode ser definido como um desequilíbrio entre a produção de radicais livres e constituintes capazes de neutralizá-los, dentre os quais encontram-se as ERO e as ERN (espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, respectivamente). O desequilíbrio gerado pode gerar danos celulares, os quais, quando em maiores proporções, podem comprometer funções celulares importantes. Dessa forma, o estresse oxidativo pode ser responsável por diversas doenças crônicas, incluindo câncer, doenças hepáticas, aterosclerose, doenças neurodegenerativas, dentre outras (TANG; HALLIWELL, 2010).

As espécies reativas apresentam um ou mais elétrons desemparelhados, e exercem ação constante sobre o organismo humano. Estas são produzidas na respiração celular, onde reações metabólicas são responsáveis pela produção de espécies reativas de oxigênio: ânion radical superóxido ( $O_2^{\cdot-}$ ), radical hidroxila ( $OH^{\cdot}$ ), alquila ( $L^{\cdot}$ ), alcóxila ( $LO^{\cdot}$ ) e peróxila ( $LOO^{\cdot}$ ). Além dessas espécies, peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e ozônio ( $O_3$ ), apesar de não serem radicais, também induzem reações radicalares. Dentre as ERN, os principais representantes são peroxinitrito ( $ONOO^{\cdot}$ ), radical óxido nítrico ( $NO^{\cdot}$ ) e dióxido de nitrogênio ( $NO_2$ ) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995; TANG; HALLIWELL, 2010; HALLIWELL, 2011).

Os principais responsáveis endógenos por manter o equilíbrio são enzimas antioxidantes, dentre as quais pode-se citar glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT), ou ainda um sistema não enzimático, onde a glutatona é o principal componente responsável. Além dos antioxidantes produzidos pelo organismo, existem os antioxidantes exógenos, que auxiliam na neutralização das espécies reativas. Entre os compostos mais abundantes provenientes da alimentação, os que apresentam maior potencial antioxidante são  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C),  $\beta$ -caroteno (provitamina A) e compostos fenólicos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995; HALLIWELL, 2000).

## 1.5 CÂNCER

O câncer é a nomenclatura utilizada para se referir a um conjunto de patologias que possuem como característica comum a proliferação desordenada de células. Essas células podem se propagar para tecidos e órgãos, podendo se difundir para outras regiões do corpo. Os principais fatores responsáveis pelo desenvolvimento dessas patologias são relacionados a fenômenos ambientais ou a características genéticas (BRASIL/INCA, 2015; OMS, 2015).

Os tumores são classificados como benignos ou malignos, sendo que os benignos, geralmente, estão localizados em tecidos e órgãos específicos, não apresentam capacidade metastática e apresentam crescimento lento. Por outro lado, os tumores malignos apresentam crescimento rápido, além de alto potencial invasivo, que pode se disseminar para outros órgãos e tecidos (YAMAGUCHI; WYCKOFF; CONDEELIS, 2005).

Em relação aos fatores ambientais, dentre os que podem contribuir para a evolução do câncer, pode-se citar o tabagismo, os

resíduos de agroquímicos em alimentos, e a exposição exagerada à radiação UV (ASHKENAZI, 2008; BENSON; LIAU, 2008). Associados a esses fatores, o envelhecimento também é responsável pelo aumento da incidência, visto que ocorre um acúmulo de fatores ambientais, com consequentes mutações genéticas (HEJMADI, 2009).

Dados epidemiológicos apontam que o câncer é responsável por um número expressivo de mortes, em todo o mundo. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, aproximadamente 27 milhões de novos casos serão diagnosticados até 2030. Outra estimativa deste mesmo órgão é que o número de mortes relacionadas ao câncer aumente cerca de 45% até 2030 (OMS, 2015).

As estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) apontam para 1,2 milhões de novos casos de câncer, em 2016 e 2017 no Brasil. Os órgãos que são mais acometidos por tumores, na população brasileira, são próstata para os homens (61,8%) e mama entre as mulheres (56%) (BRASIL/INCA, 2015). Com base nesses dados, fica clara a necessidade de medidas preventivas e agentes terapêuticos mais eficazes para o tratamento desta patologia.

## 1.6 HERPESVÍRUS

As infecções virais apresentam grande importância no cenário das doenças infecciosas, dentre as quais destacam-se as causadas pelos vírus herpéticos. Os *Herpes Simplex Virus* (HSV-1 e/ou HSV-2) são responsáveis pela infecção de cerca de 60 a 95% da população mundial adulta, principalmente, devido à capacidade de recorrência desses vírus (BRADY; BERNSTEIN, 2004; ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2013). A soroprevalência do HSV-1 em países em desenvolvimento pode chegar a 100% da população, enquanto que o HSV-2 chega a atingir a taxa 80% em algumas regiões da África (GELLER, et al., 2012).

As infecções herpéticas têm como características a latência viral, o desenvolvimento de resistência aos antivirais existentes, e o acometimento de pacientes imunocomprometidos, fatores que limitam o sucesso dos tratamentos e facilitam o agravamento dos sintomas (ROIZMAN; KNIPE; WHITLEY, 2007). A latência viral, ou seja, a presença do genoma viral no hospedeiro sem produzir partículas virais, é o principal fator que torna os HSV patógenos de extrema importância em saúde pública (STEINER; KENNEDY; PACHNER, 2007). O hospedeiro natural dos HSV é o ser humano, e sua transmissão requer o contato direto, embora haja a necessidade de uma porta de entrada, a qual pode



ser por meio de mucosas ou lesões na pele (FORSGREN; KLAPPER, 2009).

O tratamento de infecções causadas pelos HSV-1 e HSV-2 é realizado com base, principalmente, em fármacos como o aciclovir e seus derivados. Porém, o surgimento de vírus resistentes a esses fármacos, tornou necessária a busca por novos e eficientes medicamentos antivirais, no sentido de suprir essa lacuna (ROTTINGHAUS; WHITLEY, 2007).

A dificuldade de desenvolvimento de novos agentes antivirais está relacionada principalmente à natureza dos vírus, que possuem uma estrutura relativamente simples, mas dependem das células hospedeiras para se replicar. Sendo assim, as substâncias que provocam a morte viral ou inibem a replicação dos vírus, são também, em algum grau, tóxicas às células. Poucos são os estudos que avaliam o potencial antiviral dos frutos vermelhos, um exemplo foi realizado por Carvalho e colaboradores (2012), que detectaram atividade antiviral para o extrato hidroetanólico de frutos de morango frente ao HSV-1.

## 1.7 TRANSTORNO BIPOLAR

O transtorno bipolar (TB) é um transtorno de humor grave, caracterizado por alterações de humor, oscilando entre episódios de depressão, hipomania e mania, os quais podem ocorrer de forma isolada ou mista (KETTER, 2010; SUBRAMANIAM; 2013). Os episódios de mania são o marco clínico do TB e afetam sono, cognição, nível de energia assim como alterações do humor. Classicamente, pacientes em episódio de mania apresentam-se eufóricos, com necessidade de sono diminuída, aumento na energia, inquietação e agitação psicomotora (YOUNG, 2015).

O TB apresenta-se como um problema de saúde pública, visto que pode comprometer o comportamento social dos acometidos por essa patologia (SHASTRY, 2005; ROCCA; LAFER, 2006). A taxa de prevalência mostra que esse transtorno acomete de 3 a 5% da população, com altos índices de suicídio entre os pacientes, que pode chegar a 15% em pacientes jovens (MULLER-OERLINGHAUSEN, et al, 2002; ROCA; LAYFER, 2006; BEGA, 2012).

O diagnóstico do TB é realizado clinicamente e segue os parâmetros descritos no Manual Estatístico e Diagnóstico de Saúde Mental (DSM-V), o qual classifica pacientes com a ocorrência de, pelo menos, um episódio de mania ou hipomania. Estes episódios se caracterizam pelo humor persistente e anormalmente elevado, expansivo ou irritável durando, pelo menos, uma semana. Além dessas alterações de

humor, existe a necessidade de apresentar ainda, pelo menos, três desses sintomas: grandiosidade, necessidade diminuída de sono, pressão para falar, fuga de ideias, distração, aumento da atividade dirigida a objetos ou agitação psicomotora, envolvimento excessivo em atividades prazerosas (ANDREAZZA, et al., 2008).

O tratamento do TB é extremamente complexo, visto que o diagnóstico clínico muitas vezes não é claro. O tratamento medicamentoso mais eficiente para a fase de manutenção são os fármacos lítio, valproato e carbamazepina, assim como os antipsicóticos típicos, clorpromazina e haloperidol, e atípicos, olanzapina e risperidona (MATOS; SOUZA, 2005, SANCHES, et al. 2005).

O medicamento de primeira escolha para o tratamento do TB é o lítio, fármaco descoberto há mais de 50 anos e que apresenta diversas contra-indicações e efeitos colaterais, causando em muitos pacientes eficiência insatisfatória. Sendo assim, o uso em combinação com um antipsicótico tem sido uma alternativa para o tratamento do TB. (OKUMA, 1993; PRICE; HENNINGER, 1994).

Deste modo, a busca por um tratamento eficiente e com menos efeitos colaterais para o TB, patologia que envolve diferentes fatores e que não possui sua fisiopatologia completamente esclarecida, tornou-se um desafio constante para os pesquisadores envolvidos nesta área.

Estudo recentes têm demonstrado efeitos neuroprotetores de extratos de produtos naturais, como o realizado por Gazal e colaboradores (2014), o qual descreveu o efeito protetor da curcumina, um polifenol extraído do açafrão-da-india (*Curcuma longa*), em modelo de mania em ratos. Da mesma forma, outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa relatou o efeito protetor do extrato aquoso de folhas de *Cecropia pachystachya* (embaúba) em comportamento do tipo maníaco em ratos (GAZAL, et al., 2015).

Especificamente sobre frutos vermelhos, Subash e colaboradores (2014) descreveram que os compostos presentes em extratos de frutos vermelhos, como morango, mirtilo e amora, são capazes de cruzar a barreira hemato-encefálica e atuar na prevenção de doenças neurodegenerativas. No mesmo sentido, Debom e colaboradores (2016) observaram efeito protetor nos parâmetros cerebrais de estresse oxidativo, em animais tratados com um extrato de frutos de mirtilo, quando submetidos ao modelo de mania induzido por cetamina.

É importante ressaltar que não estão descritos na literatura modelos animais capazes de mimetizar o TB integralmente, pois seria necessário expressar episódios de mania e depressão no mesmo animal. Sendo assim, o principal modelo animal para TB visa mimetizar os

episódios típicos de mania, os quais expressam euforia, irritabilidade, agressividade e hiperatividade nos animais (ELLENBROEK; COOLS, 1990; BELMAKER, 2004). Com o intuito de validar as características maníacas induzidas nos animais é empregado o teste do campo aberto, desenvolvido por Hall (1936), o qual avalia a atividade locomotora e exploratória dos roedores. Nesse modelo, os principais fármacos utilizados para indução do episódio maníaco, o qual é traduzido por um efeito hiperlocomotor, são a D-anfetamina (VALVASSORI, et al., 2010), ouabaína (WANG, et al., 2013) e cetamina (GHEDIM, et al., 2012).

## 1.8 NEUROINFLAMAÇÃO

O processo inflamatório é uma resposta celular e molecular em reação a um estresse com o intuito de conter o dano ou infecção. A resposta ao processo inflamatório abrange quatro elementos: os estímulos inflamatórios, os sensores que detectam os estímulos, a consequente produção de mediadores inflamatórios, e os tecidos-alvo que serão atingidos pela resposta imune (GLASS, et al. 2010).

A resposta imune inata é responsável por reações iniciais, enquanto as respostas tardias são mediadas pela imunidade adaptativa. As reações iniciais são mecanismos de defesa pré-existentes e que se manifestam imediatamente ao agente agressor. Nesse tipo de defesa, os principais componentes celulares encontrados são: neutrófilos, monócitos, macrófagos e células *natural killer* (NK), enquanto as citocinas são os principais mediadores químicos encontrados após a ativação da resposta imune inata (SHASTRI, et al., 2013).

Um quadro de infecção sistêmica, como a indução de um processo inflamatório cerebral, pode conduzir a alterações nas funções do sistema nervoso central (SNC), podendo inclusive acarretar disfunção cognitiva (GLASS, et al. 2010). Essas características são comuns em patologias como a Doença de Alzheimer, Doença de Parkinson, e em transtornos depressivos, patologias nas quais o processo de neuroinflamação é bastante característico (GLASS, et al. 2010, HOTAMISLIGIL, 2010; CUNNINGHAM, 2013). Diversos sinalizadores são produzidos no processo inflamatório, sendo os mais importantes a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , além de quimiocinas (CUNNINGHAM, 2013; SHASTRI, et al., 2013; UBOGU, et al., 2006; CACQUEVEL, et al., 2004).

A partir do desenvolvimento de um processo neuroinflamatório, diversas vias de sinalização são ativadas, assim como componentes imunes especializados, tais como micróglia, astrócitos, citocinas e

quimiocinas, entre outras (SHASTRI, et al., 2013). Esses componentes podem ser recrutados do sistema periférico ou mesmo produzidos no SNC. A presença de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$ , IL-6 e TNF- $\alpha$ , podem prejudicar a função de diferentes áreas cerebrais, inclusive as responsáveis pela coordenação motora e pela memória (DAVIS; BAILEY, 1997).

O processo neuroinflamatório pode ser induzido de modo experimental por meio da utilização do LPS, que segundo diversos autores induz essa resposta inflamatória (LOPES, 2016; PARDON, 2015). A presença sistêmica do LPS é reconhecida por TLR4 presentes na membrana, principalmente em células da micróglia (GLEZER; SIMARD; RIVEST, 2007). Na sequência, ocorre a ativação de proteínas específicas que levam a translocação do fator nuclear kB para o núcleo, o qual é responsável por regular a produção de citocinas pró-inflamatória (BARNES; KARIN, 1997).

Sendo assim, a administração sistêmica de LPS produz um quadro de inflamação cerebral associado à infecção sistêmica, sendo geralmente associado a estudos que visam avaliar os efeitos da inflamação periférica (LOPES, 2016; PARDON, 2015; PUNTENER; et al., 2012).

## REFERÊNCIAS

- AABY, K.; EKEBERG, D.; SKREDE, G. Characterization of phenolic compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruits by different HPLC detectors and contribution of individual compounds to total antioxidant capacity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, n.11, p.4395-4406, 2007.
- ABREU, O. A.; BARRETO, G.; PRIETO, S. Vaccinium (Ericaceae): Ethnobotany and pharmacological potentials. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, v.26, n.7, p.577-591, 2014.
- ALUKO, R. Editorial overview: Functional foods and nutrition. *Current Opinion in Food Science*, 2016.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; DEKANSKI, D.; RISTIĆ, S.; RADONJIĆ N. V.; PETRONIJEVIĆ N. D.; GIAMPIERI F.; ASTOLFI, P.; GONZÁLEZ-PARAMÁS, A. M.; SANTOS-BUELGA, C.; TULIPANI, S.; QUILES, J. L.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. Strawberry polyphenols attenuate ethanol-induced gastric lesions in rats by activation of antioxidant enzymes and attenuation of MDA increase. *Plos One*, v.6, n.10, 2011.
- ALVAREZ-SUAREZ, J. M.; GIAMPIERI, F.; TULIPANI, S., CASOLI T.; STEFANO, G. D.; GONZÁLES-PARAMÁS, A. M.; SANTOS-BUELGA, C.; BUSCO, F.; QUILES, J. L.; CORDERO, M. D.; BOMPADRE, S.; MEZZETTIB.; BATTINO, M. One-month strawberry-rich anthocyanin supplementation ameliorates cardiovascular risk, oxidative stress markers and platelet activation in humans. *Journal of Nutritional Biochemistry*, v.25, n.3, p.289-294, 2014.
- AMR, A.; AL-TAMIMI, E. Stability of the crude extracts of *Ranunculus asiaticus* anthocyanins and their use as food colourants. *International Journal of Food Science & Technology*, v.42, n.8, p.985-991, 2007.
- ANDERSEN, Ø. M.; FOSSEN, T.; TORSKANGERPOLL, K.; FOSSEN, A.; HAUGE, U. Anthocyanin from strawberry (*Fragaria x ananassa*) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin. *Phytochemistry*, v.65, n.4, p.405-410, 2004.
- ANDERSEN, O. M.; MARKHAM, K. R. *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*: CRC Press, 2006.

ANDRADE, D. R. M.; HELM, C. V.; MAZZA, C. A. L.; MAZZA, M. C. M. Avaliação da composição química do araçá em duas localidades do sul do Brasil. 2012.

ANDREAZZA, A.C.; KAUER-SANT'ANNA, M.; FREY, B.N.; BOND, D.J.; KAPCZINSKI, F.; YOUNG, L.T.; YATHAM, L.N. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J. Affect. Disord.* 111, 135–144, 2008.

ANTUNES, L. E. C. Amora-preta: nova opção de cultivo no Brasil. *Ciência Rural*, v.32, n.1, p.151-158, 2002.

ANTUNES, L. E. C.; PERES, N. A. Strawberry Production in Brazil and South America. *International Journal of Fruit Science*, v.13, n.1-2, p.156-161, 2013.

ANTUNES, L. E. C.; RASEIRA, M. D. C. B. *Sistemas de Produção* 8. 2008.

ANTUNES, L. E. C.; RASSEIRA, M. Aspectos técnicos da cultura da amora-preta: Embrapa Clima Temperado, 2004.

ANTUNES, L. E. C.; TREVISAN, R.; PEREIRA, I. D. S. Produção de Amora-preta. *Seminário Brasileiro sobre Pequenas Frutas*, v.4, p.65-71, 2007.

APARECIDA DE ASSIS, S.; VELLOSA, J. C. R.; BRUNETTI, I. L.; KHALIL, N. M.; LEITE, K. M. S. C.; MARTINS, A. B. G.; OLIVEIRA, O. M. M.F. Antioxidant activity, ascorbic acid and total phenol of exotic fruits occurring in Brazil. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v.60, n.5, p.439-448, 2009.

ASHKENAZI, A. Directing cancer cells to self-destruct with pro-apoptotic receptor agonists. *Nature Reviews Drug Discovery*, v.7, n.12, p.1001-1012, 2008.

AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga: propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*, v.62, n.1, p.55-61, 2003.

AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.17, n.3-4, p.385-396, 2004.

BAGETTI, M.; FACCO, E. M. P.; RODRIGUES, D. B. Antioxidant capacity and composition of pitanga seeds. *Ciencia Rural*, v.39, n.8, p.2504-2510, 2009.

BALKAU, B.; VALENSI, P.; ESCHWÈGE, E. A review of the metabolic syndrome. *Diabetes and Metabolism*, v.33, n.6, p.405-413, 2007.

BARNES, P.J.; KARIN, M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 336(15):1066-71, 1997.

BASU, A.; DU, M.; LEYVA, M. J.; SANCHEZ K.; BETTS N. M.; WU M.; ASTON, C. E.; LYONS, T. J. Blueberries decrease cardiovascular risk factors in obese men and women with metabolic syndrome. *Journal of Nutrition*, v.140, n.9, p.1582-1587, 2010.

BASU, A.; WILKINSON, M.; PENUGONDA, K.; SIMMONS, B.; BETTS, N. M.; LYONS, T. J. Freeze-dried strawberry powder improves lipid profile and lipid peroxidation in women with metabolic syndrome: Baseline and post intervention effects. *Nutrition Journal*, v.8, n.1, 2009.

BEGA S, SCHAFFER A, GOLDSTEIN B, LEVITT A. Differentiating between Bipolar Disorder Types I and II: Results from the National Epidemiologic Survey on Alcohol and Related Conditions (NESARC). *J Affect Disord*. 138(1-2):46-53, 2012.

BELMAKER RH. Bipolar disorder. *N Engl J Med*. 351(5):476-86, 2004.

BENSON, J. R.; LIAU, S. S. Cancer Genetics: A Primer for Surgeons. *Surgical Clinics of North America*, v.88, n.4, p.681-704, 2008.

BIEGELMEYER, R.; ANDRADE, J. M. M.; ABOY, A. L. Comparative Analysis of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Red (*Psidium cattleianum*) and Yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) Strawberry Guava Fruit. *Journal of Food Science*, v.76, n.7, p.C991-C996, 2011.

BOULTON, R. The copigmentation of anthocyanins and its role in the color of red wine: A critical review. *American Journal of Enology and Viticulture*, v.52, n.2, p.67-87, 2001.

BOURSCHEID, K.; VIEIRA, N. K.; LISBÔA, G. N. *Eugenia uniflora* - Pitangueira. In: CORADIN, L.; SIMINSKI, A.; REIS, A. (Ed.). *Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial*. ed. Brasília: Ministério do Meio Ambiente, p. 170-177, 2011.

BRADY, R. C.; BERNSTEIN, D. I. Treatment of herpes simplex virus infections. *Antiviral Research*, v.61, n.2, p.73-81, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer (INCA). Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>

BUENDIA, B.; GIL, M. I.; TUDELA, J. A.; GADY, A. L.; MEDINA, J. J.; SORIA, C.; LÓPEZ, J. M.; TOMÁS-BARBERÁN, F. A. HPLC-MS analysis of proanthocyanidin oligomers and other phenolics in 15 strawberry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.58, n.7, p.3916-26, 2010.

BUENO, J. M.; RAMOS-ESCUADERO, F.; SÁEZ-PLAZA, P. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part I: General Considerations Concerning Polyphenols and Flavonoids. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v.42, n.2, p.102-125, 2012a.

BUENO, J. M.; SÁEZ-PLAZA, P.; RAMOS-ESCUADERO, F. Analysis and Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. Part II: Chemical Structure, Color, and Intake of Anthocyanins. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, v.42, n.2, p.126-151, 2012b.

BURTON-FREEMAN, B.; LINARES, A.; HYSON, D.; KAPPAGODA, T. Strawberry modulates LDL oxidation and postprandial lipemia in response to high-fat meal in overweight hyperlipidemic men and women. *Journal of the American College of Nutrition*, v.29, n.1, p.46-54, 2010.

CACQUEVEL, M.; LEBEURRIER, N.; CHEENNE, S.; VIVIEN, D. Cytokines in neuroinflammation and Alzheimer's disease. *Curr Drug Targets*, v. 5, n. 6, p. 529-534, 2004.

CANNON, R. J.; AGYEMANG, D.; CURTO, N. L.; YUSUF, A.; CHEN, M. Z.; JANCZUK, A. J. In-depth analysis of Ciflorette strawberries (*Fragaria* × *ananassa* 'Ciflorette') by multidimensional gas chromatography and gas chromatography-olfactometry. *Flavour and Fragrance Journal*, v.30, n.4, p.302-319, 2015.

CARLTON, P. S.; KRESTY, L. A.; SIGLIN, J. C.; MORSE, M. A.; LU, J.; MORGAN, C.; STONER, G. D. Inhibition of N-nitrosomethylbenzylamine-induced tumorigenesis in the rat esophagus by dietary freeze-dried strawberries. *Carcinogenesis*, v.22, n.3, p.441-446, 2001.



CARVALHO, A.; BLUM-SILVA, C. H.; CALVETE, E., et al. Anti HSV-1 activity of five strawberry cultivars. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.31, n.1, p.133-137, 2012.

CARVALHO, F. B.; GUTIERRES, J. M.; BUENO, A.; AGOSTINHO, P.; ZAGO, A. M.; VIEIRA, J.; FRÜHAUF, P.; CECHELLA, J. L.; NOGUEIRA, C. W.; OLIVEIRA, S. M.; RIZZI, C.; SPANEVELLO, R. M.; DUARTE, M. M. F.; DUARTE, T.; DELLAGOSTIN, O. A.; ANDRADE, C. M. Anthocyanins control neuroinflammation and consequent memory dysfunction in mice exposed to lipopolysaccharide. *Mol Neurobiol*, 54:3350-3367, 2016.

CASTAÑEDA-OVANDO, A.; PACHECO-HERNÁNDEZ, M. D. L.; PÁEZ-HERNÁNDEZ, M. E.; RODRIGUEZ, J. A.; GALÁN-VIDAL, C. A. Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, v.113, n.4, p.859-871, 2009.

CASTILLA, P.; DÁVALOS, A.; TERUEL, J. L.; CERRATO, F.; FERNÁNDEZ-LUCAS, M.; MERINO, J. L.; SÁNCHEZ-MARTÍN, C. C.; ORTUÑO, J.; LASUNCIÓN, M. A. Comparative effects of dietary supplementation with red grape juice and vitamin E on production of superoxide by circulating neutrophil NADPH oxidase in hemodialysis patients. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.87, n.4, p.1053-1061, 2008.

CAVALCANTI, R. N.; SANTOS, D. T.; MEIRELES, M. A. A. Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview. *Food Research International*, v.44, n.2, p.499-509, 2011.

CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. *Food Research International*, v.44, n.8, p.2442-2451, 2011.

CHEN, J.; LICHWA, J.; RAY, C. Essential oils of selected hawaiian plants and associated litters. *Journal of Essential Oil Research*, v.19, n.3, p.276-278, 2007.

CHUN, J.; LEE, J.; YE, L.; EXLER J.; EITENMILLER, R. R. Tocopherol and tocotrienol contents of raw and processed fruits and vegetables in the United States diet. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.19, n.2-3, p.196-204, 2006.

CHUNG, D. W.; YOO, K. Y.; HWANG, I. K.; KIM, D. W.; CHUNG, J. Y.; LEE, C. H.; CHOI, J. H.; CHOI, S. Y.; YOUN, H. Y.; LEE, I. S.; WON, M. H. Systemic administration of lipopolysaccharide induces cyclooxygenase-2 immunoreactivity in endothelium and increases microglia in the mouse hippocampus. *Cell Mol Neurobiol*, v. 30, n. 4, p. 531-541, 2010.

CUNNINGHAM, C. Microglia and neurodegeneration: the role of systemic inflammation. *Glia*, v. 61, n. 1, p. 71-90, 2013.

ÇOBAN, E. P.; BIYIK, H. Antimicrobial activity of the ethanol extracts of some plants natural growing in Aydin, Turkey. *African Journal of Microbiology Research*, v.4, n.21, p.2318-2323, 2010.

DAUBENY, H. Brambles. *Fruit breeding*, v.2, p.109-190, 1996.

DAVIS, J. M.; BAILEY, S. P. Possible mechanisms of central nervous system fatigue during exercise. *Med Sci Sports Exerc*, v. 29, n. 1, p. 4557, 1997.

DE PASCUAL-TERESA, S.; SANCHEZ-BALLESTA, M. T. Anthocyanins: From plant to health. *Phytochemistry Reviews*, v.7, n.2, p.281-299, 2008.

DEBOM, G., GAZAL, M., SOARES, M. S. P., COUTO, C. A. T., MATTOS, B., LENCINA, C., KASTER, M. P., GHISLENI, G. C., TAVARES, R., BRAGANHOL, E., CHAVES, V. C., REGINATTO, F. H., STEFANELLO, F., SPANEVELLO, R. M. Preventive effects of blueberry on behavioral and biochemical dysfunctions in rats submitted to a model of manic behavior induced by ketamine. *Brain Res. Bull.* 127, 260 – 269, 2016.

DEFURIA, J.; BENNETT, G.; STRISSEL, K. J.; PERFIRD J. W.; MILBURY, P. E.; GREENBERG, A. S.; OBIN, M. S. Dietary blueberry attenuates whole-body insulin resistance in high fat-fed mice by reducing adipocyte death and its inflammatory sequelae. *Journal of Nutrition*, v.139, n.8, p.1510-1516, 2009.

DEL RIO, D.; BORGES, G.; CROZIER, A. Berry flavonoids and phenolics: Bioavailability and evidence of protective effects. *British Journal of Nutrition*, v.104, n.SUPPL.3, p.S67-S90, 2010.

DENARDIN, C. C.; HIRSCH, G. E.; DA ROCHA, R. F.; VIZZOTTO, M.; HENRIQUES, A. T.; MOREIRA, J. C. F.; GUMA, F. T.C.R.; EMANUELLI, T. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four

- Brazilian native fruits. *Journal of Food and Drug Analysis*, v.23, n.3, p.387-398, 2015.
- DÍAZ-GARCÍA, M. C.; OBÓN, J. M.; CASTELLAR, M. R.; COLLADO, J.; ALACID, M. Quantification by UHPLC of total individual polyphenols in fruit juices. *Food Chemistry*, v.138, n.2-3, p.938-949, 2013.
- DONNO, D.; CERUTTI, A. K.; MELLANO, M. G.; PRGOMET, Z.; BECCARO, G. L. Serviceberry, a berry fruit with growing interest of industry: Physicochemical and quali-quantitative health-related compound characterisation. *Journal of Functional Foods*, v.26, p.157-166, 2016.
- ECKEL, R. H.; GRUNDY, S. M.; ZIMMET, P. Z. The metabolic syndrome. *Lancet*, v.365, n.9468, p.1415-1428, 2005.
- EGEA, M. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; CACHO, J.; FERREIRA, V.; LOPEZ, R. Comparative analysis of aroma compounds and sensorial features of strawberry and lemon guavas (*Psidium cattleianum* Sabine). *Food Chemistry*, v.164, p.272-277, 2014.
- EHLENFELDT, M. K.; ROWLAND, L. J.; OGDEN, E. L.; VINYARD, B. T.; Cold-hardiness, acclimation, and deacclimation among diverse blueberry genotypes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, v.137, n.1, p.31-37, 2012.
- EINBOND, L. S.; REYNERTSON, K. A.; LUO, X. D.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chemistry*, v.84, n.1, p.23-28, 2004.
- ELISIA, I.; POPOVICH, D. G.; HU, C.; KITTS, D. D. Evaluation of viability assays for anthocyanins in cultured cells. *Phytochemical Analysis*, v.19, n.6, p.479-486, 2008.
- ELLENBROEK BA, COOLS AR. Animal models with construct validity for schizophrenia. *Behav Pharmacol*. 1(6):469-90, 1990.
- ELLINGSEN, I.; HJERKINN, E. M.; SELJEFLOT, I.; ARNESEN, H. Consumption of fruit and berries is inversely associated with carotid atherosclerosis in elderly men. *British Journal of Nutrition*, v.99, n.3, p.674-681, 2008.
- ERLUND, I.; KOLI, R.; ALFTHAN, G.; MARNIEMI, J.; PUUKKA, P.; MUSTONEN, P.; MATTILA, P.; JULA, A. Favorable effects of berry consumption on platelet function, blood pressure, and HDL cholesterol. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.87, n.2, p.323-331, 2008.

ESCRIBANO-BAILÓN, M. T.; SANTOS-BUELGA, C. Anthocyanin copigmentation - Evaluation, mechanisms and implications for the Colour of Red Wines. *Current Organic Chemistry*, v.16, n.6, p.715-723, 2012.

FAN-CHIANG, H. J.; WROLSTAD, R. E. Anthocyanin pigment composition of blackberries. *Journal of Food Science*, v.70, n.3, p.C198-C202, 2005.

FAO. FAOSTAT: Agricultural Production/strawberry. <http://www.faostat.fao.org>: p. 2011. Disponível em: Acesso em: Acessado em Dez - 2015.

FERNÁNDEZ-LARA, R.; GORDILLO, B.; RODRÍGUEZ-PULIDO, F. J. Assessment of the differences in the phenolic composition and color characteristics of new strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars by HPLC-MS and Imaging Tristimulus Colorimetry. *Food Research International*, v.76, p.645-653, 2015.

FISHER, N. D. L.; HOLLENBERG, N. K. Flavanols for cardiovascular health: The science behind the sweetness. *Journal of Hypertension*, v.23, n.8, p.1453-1459, 2005.

FIUZA, T. S.; REZENDE, M. H.; SABÓIA-MORAIS, S. M. Caracterização farmacognóstica das folhas de *Eugenia uniflora* L.(Myrtaceae). *Revista Eletrônica de Farmácia*, v.5, n.2, 2008.

FLESCHHUT, J.; KRATZER, F.; RECHKEMMER, G. Stability and biotransformation of various dietary anthocyanins in vitro. *Eur J Nutr*, v.45, n.1, p.7-18, 2006.

FOGLIANO, V.; VITAGLIONE, P. Functional foods: Planning and development. *Molecular Nutrition and Food Research*, v.49, n.3, p.256-262, 2005.

FOLMER, F.; BASAVARAJU, U.; JASPARS, M. Anticancer effects of bioactive berry compounds. *Phytochemistry Reviews*, v.13, n.1, p.295-322, 2014.

FORSGREN, M.; KLAPPER, P. E. Herpes Simplex Virus Type 1 and Type 2. In: (Ed.). *Principles and Practice of Clinical Virology: Sixth Edition*. ed.: John Wiley and Sons, 2009. p. 95-131.

FRAZON, R.; CAMPOS, L.; PROENÇA, C. Aracás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Embrapa Cerrados. Planaltina, 2009.

- GAO, L.; MAZZA, G. Quantitation and distribution of simple and acylated anthocyanins and other phenolics in blueberries. *Journal of Food Science*, v.59, n.5, p.1057-1059, 1994.
- GAZAL, M., VALENTE, M. R., ACOSTA, B. A., KAUFMANN, F. N., BRAGANHOL, E., LENCINA, C. L., STEFANELLO, F. M., GHISLENI, G., KASTER, M. P. Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamine-induced model of mania in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 5, p. 132-139, 2014.
- GAZAL, M., KAUFMANN, F. N., ACOSTA, B. A., OLIVEIRA, P. S., VALENTE, M. R., ORTAMANN, C. F., STURBELLE, R., LENCINA, L. C., STEFANELLO, F. M., KASTER, M. P., REGINATTO, F. H., GHISLENI, G. Preventive Effect of *Cecropia pachystachya* Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats. *Neurochem Res.* 40 (7), 1421 – 1430, 2015.
- GELLER, M.; SUCHMACHER NETO, M.; RIBEIRO, M. G. Herpes simples: atualização clínica, epidemiológica e terapêutica. *J. Bras. Doenças Sex. Transm*, v.24, p.260-266, 2012.
- GIUSTI, M.; WROLSTAD, R. E. Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-visible Spectroscopy. In: (Ed.). *Handbook of Food Analytical Chemistry*. ed.: John Wiley and Sons Ltd., v.2-2, p. 19-31, 2005.
- GHEDIM, F. V., FRAGA, D. DE B., DEROZA, P. F., OLIVEIRA, M. B., VALVASSORI, S. S., STECKERT, A. V., BUDNI, J., DALPIZZOL, F., QUEVEDO, J.; ZUGNO, A. L. Evaluation of behavioral and neurochemical changes induced by ketamine in rats: implications as an animal model of mania. *Journal of Psychiatric Research*, v. 46, p. 1569-1575, 2012.
- GLASS, C.K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; MARCHETTO, M. C.; GAGE, F. H. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. *Cell*, 140, 918-934, 2010.
- GLEZER, I.; SIMARD, A. R.; RIVEST, S. Neuroprotective role of the innate immune system by micrógliia. *Neuroscience*. 147, 867-883, 2007.
- GRACE, M. H.; RIBNICKY, D. M.; KUHN, P. Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, *Vaccinium angustifolium* Aiton. *Phytomedicine*, v.16, n.5, p.406-415, 2009.

GRIFFIS, J. L.; SAMS, C. E.; MANNERS, M. M. Purple-fruited pitanga - Antioxidant levels and flavors of mature fruits vary considerably among closely related cultivars. *Acta Horticulturae*. SANTOS, C. A. F.; GRIFFIS, J. L.; MITRA, S. K. 959: 209-216 p. 2012.

GUPTA, S.; SODHI, S.; MAHAJAN, V. Correlation of antioxidants with lipid peroxidation and lipid profile in patients suffering from coronary artery disease. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, v.13, n.8, p.889-894, 2009.

HALL, C. S. Emotional behavior in rats. Part II. The relationship between need and emotionality. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 22, p. 61-68, 1936.

HALLIWELL, B. Antioxidant activity and other biological effects of flavonoids. *International Congress and Symposium Series - Royal Society of Medicine*: p.13-23, 2000.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants - Quo vadis? *Trends in Pharmacological Sciences*, v.32, n.3, p.125-130, 2011.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, v.18, n.1, p.125-126, 1995.

HAMAMATSU, S.; YABE, K.; NAWA, Y. Compositions of anthocyanin and other flavonoids in cultured cells of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade cv. Tifblue). *Food Science and Technology Research*, v.10, n.3, p.239-246, 2004.

HE, B.; ZHANG, L. L.; YUE, X. Y. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*, v.204, p.70-76, 2016.

HE, J.; GIUSTI, M. Anthocyanins: Natural colorants with health-promoting properties. *Annual Review of Food Science and Technology*, v.1, n.1, p.163-187, 2010.

HEJMADI, M. *Introduction to cancer biology*: Bookboon, 2009.

HOFFMANN-RIBANI, R.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonols in fresh and processed Brazilian fruits. *Journal of food composition and analysis*, v.22, n.4, p.263-268, 2009.

HOLM, T. H.; DRAEBY, D.; OWENS, T. Microglia are required for astroglial Toll-like receptor 4 response and for optimal TLR2 and TLR3 response. *Glia*. 60, 630-638, 2012.

HORVAT, R. J.; SCHLOTZHAUER, W. S.; CHORTYK, O. T. Comparison of volatile compounds from Rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) and deerberry (*V. stamineum*) during maturation. Journal of Essential Oil Research, v.8, n.6, p.645-648, 1996.

HOTAMISLIGIL, G. S. Endoplasmic reticulum stress and the inflammatory basis of metabolic disease. Cell, v. 140, n. 6, p. 900-917, 2010.

HUANG, W. Y.; ZHANG, H. C.; LIU, W. X. Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. Journal of Zhejiang University SCIENCE B, v.13, n.2, p.94-102, 2012.

JIN, P.; WANG, S. Y.; WANG, C. Y. Effect of cultural system and storage temperature on antioxidant capacity and phenolic compounds in strawberries. Food Chemistry, v.124, n.1, p.262-270, 2011.

JOSEPH, S. V.; EDIRISINGHE, I.; BURTON-FREEMAN, B. M. Berries: Anti-inflammatory effects in humans. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.62, n.18, p.3886-3903, 2014.

JOSINO SOARES, D.; WALKER, J.; PIGNITTER, M. Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit juice and two major constituents thereof exhibit anti-inflammatory properties in human gingival and oral gum epithelial cells. Food and Function, v.5, n.11, p.2981-2988, 2014.

JOSUTTIS, M.; VERRALL, S.; STEWART, D. Genetic and environmental effects on tannin composition in strawberry (*Fragaria × ananassa*) cultivars grown in different European locations. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.61, n.4, p.790-800, 2013.

JOVITO, V. C.; FREIRES, I. A.; ALMEIDA, L. F. Activity of in vitro forms of dentifrices containing the hydroalcoholic extract of the ripe fruit of *Eugenia uniflora* L. (Surinam cherry) on cariogenic bacteria. Acta odontológica latinoamericana: AOL, v.24, n.1, p.41-46, 2011.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; HEINONEN, M. Berry phenolics and their antioxidant activity. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.49, n.8, p.4076-4082, 2001.

KAJDZANOSKA, M.; PETRESKA, J.; STEFOVA, M. Comparison of different extraction solvent mixtures for characterization of phenolic compounds in strawberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.59, n.10, p.5272-8, 2011.

- KAUR, S.; DAS, M. Functional foods: An overview. *Food Science and Biotechnology*, v.20, n.4, p.861-875, 2011.
- KELEBEK, H.; SELLI, S. Characterization of phenolic compounds in strawberry fruits by RP-HPLC-DAD and investigation of their antioxidant capacity. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, v.34, n.20, p.2495-2504, 2011.
- KETTER TA. Diagnostic features, prevalence, and impact of bipolar disorder. *J Clin Psychiatry*. 71(6):e14, 2010.
- KHAN, N.; SYED, D. N.; AHMAD, N. Fisetin: A dietary antioxidant for health promotion. *Antioxidants and Redox Signaling*, v.19, n.2, p.151-162, 2013.
- KNOX, Y. M.; SUZUTANI, T.; YOSIDA, I. Anti-influenza virus activity of crude extract of *Ribes nigrum* L. *Phytotherapy Research*, v.17, n.2, p.120-122, 2003.
- KRIKORIAN, R.; NASH, T. A.; SHIDLER, M. D. Concord grape juice supplementation improves memory function in older adults with mild cognitive impairment. *British Journal of Nutrition*, v.103, n.5, p.730-734, 2010a.
- KRIKORIAN, R.; SHIDLER, M. D.; NASH, T. A. Blueberry supplementation improves memory in older adults. *Journal of agricultural and food chemistry*, v.58, n.7, p.3996-4000, 2010b.
- LAL, S.; AHMED, N.; SINGH, S. R. Variability of health and bioactive compounds in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.) cultivars grown under an Indian temperate ecosystem. *Fruits*, v.68, n.5, p.423-434, 2013.
- LANDRUM, L. R.; KAWASAKI, M. L. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, v.49, n.4, p.508-536, 1997.
- LEE, J. H.; BAE, S. Y.; OH, M. Antiviral effects of black raspberry (*Rubus coreanus*) seed extract and its polyphenolic compounds on norovirus surrogates. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, v.80, n.6, p.1196-1204, 2016a.
- LEE, J. H.; OH, M.; SEOK, J. H. Antiviral effects of black raspberry (*Rubus coreanus*) seed and its gallic acid against influenza virus infection. *Viruses*, v.8, n.6, 2016b.



- LI, C.; FENG, J.; HUANG, W. Y. Composition of polyphenols and antioxidant activity of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) in Nanjing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.61, n.3, p.523-531, 2013.
- LI, W.; HE, S.; GU, G. The volatile constituents in fruit of blackberry (*Rubus sp.*). *Chinese Pharmaceutical Journal*, v.33, n.6, p.335-336, 1998.
- LI, W.; HYDAMAKA, A. W.; LOWRY, L. Comparison of antioxidant capacity and phenolic compounds of berries, chokecherry and seabuckthorn. *Central European Journal of Biology*, v.4, n.4, p.499-506, 2009.
- LI, Y.; HE, Y. Anthocyanin content and antioxidant activity of different varieties blueberries. 2nd International Conference on Energy, Environment and Sustainable Development, EESD 2012. Jilin. 610-613: 3421-3427, 2013.
- LI, Y.; ZHANG, J. J.; XU, D. P. Bioactivities and health benefits of wild fruits. *International Journal of Molecular Sciences*, v.17, n.8, 2016.
- LIU, Z.; SCHWIMMER, J.; LIU, D. Black raspberry extract and fractions contain angiogenesis inhibitors. *Journal of agricultural and food chemistry*, v.53, n.10, p.3909-3915, 2005.
- LOHACHOOMPOL, V.; MULHOLLAND, M.; SRZEDNICKI, G. Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. *Food Chemistry*, v.111, n.1, p.249-254, 2008.
- LOPES, P. C. LPS and neuroinflammation: a matter of timing. *Inflammopharmacology*, 2016.
- LOPES-DA-SILVA, F.; DE PASCUAL-TERESA, S.; RIVAS-GONZALO, J. Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. *European Food Research and Technology*, v.214, n.3, p.248-253, 2002.
- LUBY, J. J.; BALLINGTON, J. R.; DRAPER, A. D. Blueberries and Cranberries (*Vaccinium*): International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, 1991. 393-458 p.
- LUXIMON-RAMMA, A.; BAHORUN, T.; CROZIER, A. Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.83, n.5, p.496-502, 2003.

- MARINOVA, D.; RIBAROVA, F. HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries. *Journal of Food Composition and Analysis*, v.20, n.5, p.370-374, 2007.
- MARQUES, F. A.; WENDLER, E. P.; MAIA, B. H. L. N. S. Volatile oil of *Psidium cattleianum* Sabine from the Brazilian Atlantic Forest. *Journal of Essential Oil Research*, v.20, n.6, p.519-520, 2008.
- MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; MORENO, I. A. M. Antioxidant activity of different pitanga (*Eugenia uniflora* L.) fruit fractions. *Journal of Food, Agriculture and Environment*, v.11, n.1, p.288-293, 2013.
- MATOS E SOUZA, F.G. Tratamento de Transtorno Bipolar: Eutimia. *Rev Psiquiatr Clin.*, 32, suppl.1, 63-70, 2005.
- MEDINA, A. L.; HAAS, L. I. R.; CHAVES, F. C. Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. *Food Chemistry*, v.128, n.4, p.916-922, 2011.
- MEDZHITOV, R.; JANEWAY, C. Innate immune: impact on the adaptative immune response. *Current Opinion in Immunology*. 9:4-9, 1997.
- MEYERS, K. J.; WATKINS, C. B.; PRITTS, M. P. Antioxidant and Antiproliferative Activities of Strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.51, n.23, p.6887-6892, 2003.
- MOHAMED, A. R. M. A. W.; JĘCZ, T.; KORBIN, M. The history of genome mapping in *Fragaria* spp. *Journal of Horticultural Research*, v.22, n.2, p.93-103, 2014.
- MULLEN, W.; LEAN, M. E. J.; CROZIER, A. Rapid characterization of anthocyanins in red raspberry fruit by high-performance liquid chromatography coupled to single quadrupole mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, v.966, n.1-2, p.63-70, 2002.
- MÜLLER-OERLINGHAUSEN, B.; BERGHÖFER, A.; MICHAEL, B. Bipolar disorder. *Lancet*, 359, 241-247, 2002.
- NAKAJIMA, J. I.; TANAKA, I.; SEO, S. LC/PDA/ESI-MS profiling and radical scavenging activity of anthocyanins in various berries. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, v.2004, n.5, p.241-247, 2004.
- NAWA, Y.; ASANO, S.; MOTOORI, S. Production of anthocyanins, carotenoids, and proanthocyanidins by cultured cells of rabbiteye

blueberry (*Vaccinium ashei* reade). Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, v.57, n.5, p.770-774, 1993.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. Journal of Natural Products, v.79, n.3, p.629-661, 2016.

OBÓN, J. M.; DÍAZ-GARCÍA, M. C.; CASTELLAR, M. R. Red fruit juice quality and authenticity control by HPLC. Journal of Food Composition and Analysis, v.24, n.6, p.760-771, 2011.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. International Journal of Aromatherapy, v.15, n.3, p.147-152, 2005.

OKUMA, T. Effects of carbamazepine and lithium on affective disorders. Neuropsychobiology, 27, 138-145, 1993.

OLIVEIRA, A. L.; DESTANDAU, E.; FOUGÈRE, L. Isolation by pressurised fluid extraction (PFE) and identification using CPC and HPLC/ESI/MS of phenolic compounds from Brazilian cherry seeds (*Eugenia uniflora* L.). Food Chemistry, v.145, p.522-529, 2014.

OLIVEIRA, A. L.; LOPES, R. B.; CABRAL, F. A. Volatile compounds from pitanga fruit (*Eugenia uniflora* L.). Food Chemistry, v.99, n.1, p.1-5, 2006.

OLIVEIRA, P. S.; CHAVES, V. C.; BONA, P. B.; SOARES, M. P. S.; CARDOSO, J. S.; VASCONCELLOS, F. A.; TAVARESA, R. G.; VIZZOTTO, M.; SILVA, L. M. C.; GRECCO, F. B.; GAMARO, G. D.; SPANEVELLO, R. M.; LENCINA C. L.; REGINATTO, F. H.; STEFANELLO, F. M. *Eugenia uniflora* fruit (red type) standardized extract: a potential pharmacological tool to diet-induced metabolic syndrome damage management. Biomedicine & Pharmacotherapy 92, 935–941, 2017.

ONO, M.; KOTO, M.; KOMATSU, H. Cytotoxic triterpenes and sterol from the fruit of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*). Food Science and Technology Research, v.10, n.1, p.56-59, 2004.

ONO, M.; MASUOKA, C.; KOTO, M. Antioxidant ortho-benzoyloxyphenyl acetic acid ester, vaccihehin A, from the fruit of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*). Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v.50, n.10, p.1416-1417, 2002.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS, 2015), Câncer. Disponível em: <http://www.who.int/cancer/en/>

PARDON, M. C. Lipopolysaccharide hyporesponsiveness: protective or damaging response to the brain? *Rom J Morphol Embryol.* 56(3):903–913, 2015.

PARK, S. J.; CHOI, Y. B.; KO, J. R., et al. Enhancement of antioxidant activities of blueberry (*Vaccinium ashei*) by using high-pressure extraction process. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, v.43, n.3, p.471-476, 2014.

PENG, C. H.; LIU, L. K.; CHUANG, C. M., et al. Mulberry water extracts possess an anti-obesity effect and ability to inhibit hepatic lipogenesis and promote lipolysis. *Journal of agricultural and food chemistry*, v.59, n.6, p.2663-2671, 2011.

PEREIRA, D. M.; VALENTÃO, P.; PEREIRA, J. A. Phenolics: From chemistry to biology. *Molecules*, v.14, n.6, p.2202-2211, 2009.

PINO, J. A.; MARBOT, R.; VÁZQUEZ, C. Characterization of volatiles in strawberry guava (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.49, n.12, p.5883-5887, 2001.

PORCU, O. M.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Variation in the carotenoid composition of the lycopene-rich Brazilian fruit *Eugenia uniflora* L. *Plant Foods for Human Nutrition*, v.63, n.4, p.195-199, 2008.

PRICE, L.H.; HENINGER, G.R. Lithium in the treatment of mood disorders. *N Engl J Med.*, 331, 591-598, 1994.

PRIOR, R. L.; WU, X. Anthocyanins: Structural characteristics that result in unique metabolic patterns and biological activities. *Free Radical Research*, v.40, n.10, p.1014-1028, 2006.

PRIOR, R. L.; WU, X.; GU, L. Whole berries versus berry anthocyanins: Interactions with dietary fat levels in the C57BL/6J mouse model of obesity. *Journal of agricultural and food chemistry*, v.56, n.3, p.647-653, 2008.

PÜNTENER, U.; BOOTH, S.G.; PERRY, V.H.; TEELING, J.L. Long-term impact of systemic bacterial infection on the cerebral vasculature and microglia. *J Neuroinflammation*, 9:146, 2012.

RAMIREZ, M. R.; APEL, M. A.; RASEIRA, M. C. B. Polyphenol content and evaluation of antichemotactic, antiedematogenic and

antioxidant activities of *rubus* sp. cultivars. *Journal of Food Biochemistry*, v.35, n.5, p.1389-1397, 2011.

RAMIREZ, M. R.; GUTERRES, L.; DICKEL, O. E. Preliminary studies on the antinociceptive activity of *Vaccinium ashei* berry in experimental animal models. *Journal of medicinal food*, v.13, n.2, p.336-342, 2010.

RASEIRA, M. Contribuição ao estudo do araçazeiro, *Psidium cattleianum*. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado-Pelotas, RS: EMBRAPA-CPACT, 1996.

RAVEN, P.; EVERT, R.; EICHHORN, S. *Biologia Vegetal*. 7a. Coord. Trad, 2007.

REYES-CARMONA, J.; YOUSEF, G. G.; MARTÍNEZ-PENICHE, R. A. Antioxidant capacity of fruit extracts of blackberry (*Rubus* sp.) produced in different climatic regions. *Journal of Food Science*, v.70, n.7, p.S497-S503, 2005.

RIBEIRO, A. B.; CHISTÉ, R. C.; FREITAS, M. *Psidium cattleianum* fruit extracts are efficient in vitro scavengers of physiologically relevant reactive oxygen and nitrogen species. *Food Chemistry*, v.165, p.140-148, 2014.

RIMANDO, A. M.; KALT, W.; MAGEE, J. B. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in *Vaccinium* berries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, n.15, p.4713-4719, 2004.

RISSANEN, T. H.; VOUTILAINEN, S.; VIRTANEN, J. K. Low intake of fruits, berries and vegetables is associated with excess mortality in men: The Kuopio Ischaemic Heart Disease Risk Factor (KIHD) Study. *Journal of Nutrition*, v.133, n.1, p.199-204, 2003.

ROCCA, C.C.; LAFER, B. Neuropsychological disturbances in bipolar disorder. *Rev Bras Psiquiatr*. 28(3):226-37, 2006.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; FREITAS, A. C. Analytical strategies for characterization and validation of functional dairy foods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v.41, p.27-45, 2012.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D.; WHITLEY, R. Herpes simplex viruses, p 2501–2601. *Fields virology*, v.2, 2007.

ROIZMAN, B.; KNIPE, D. M.; WHITLEY, R. J. Herpes simplex viruses. In: (Ed.). *Fields Virology: Sixth Edition*. ed.: Wolters Kluwer Health Adis (ESP), v.1, 2013.

- ROTTINGHAUS, S. T.; WHITLEY, R. J. Current non-AIDS antiviral chemotherapy. Expert review of anti-infective therapy, v.5, n.2, p.217-230, 2007.
- SANCHES, R.F.; ASSUNÇÃO, S.; HETEM, L.A.B. Impacto da comorbidade no diagnóstico e tratamento do transtorno bipolar. Revista de Psiquiatria. Clínica. p. 71-77, 2005.
- SANTOS, D. N.; DE SOUZA, L. L.; DE OLIVEIRA, C. A. F. Arginase inhibition, antibacterial and antioxidant activities of Pitanga seed (*Eugenia uniflora* L.) extracts from sustainable technologies of high pressure extraction. Food Bioscience, v.12, p.93-99, 2015.
- SCHIEBER, A. Functional Foods and Nutraceuticals. Food Research International, v.46, n.2, p.437, 2012.
- SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; ZHANG, Y. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.54, n.25, p.9329-9339, 2006a.
- SEERAM, N. P. Bioactive polyphenols from foods and dietary supplements: Challenges and opportunities. ACS Symposium Series. WANG, M.; HO, C. T.; SANG, S.; HWANG, L. S. 925: 25-38 p. 2006b.
- SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-grown blueberries and blackberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.50, n.8, p.2432-2438, 2002.
- SHASTRI, A.; BONIFATI, D. M.; KISHORE, U. Innate immunity and neuroinflammation. Mediators of inflammation. 342931, 2013.
- SHASTRY, B.S. Bipolar disorder: an update. Neurochem Int. 46(4):273-9, 2005.
- SHUKITT-HALE, B.; CHENG, V.; JOSEPH, J. A. Effects of blackberries on motor and cognitive function in aged rats. Nutritional Neuroscience, v.12, n.3, p.135-140, 2009.
- SILVA, N. A. D.; RODRIGUES, E.; MERCADANTE, A. Z. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.62, n.22, p.5072-5084, 2014.

- SIMIRGIOTIS, M. J.; THEODULOZ, C.; CALIGARI, P. D. S. Comparison of phenolic composition and antioxidant properties of two native Chilean and one domestic strawberry genotypes. *Food Chemistry*, v.113, n.2, p.377-385, 2009.
- SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R. E.; FINN, C. E. Influence of cultivar, maturity, and sampling on blackberry (*Rubus* L. hybrids) anthocyanins, polyphenolics, and antioxidant properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, n.26, p.8021-8030, 2004.
- SMERIGLIO, A.; BARRECA, D.; BELLOCCO, E. Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phytotherapy Research*, p.1265-1286, 2016.
- SOARES-SILVA, L. H.; PROENÇA, C. E. B. A new species of *Psidium* L. (Myrtaceae) from southern Brazil. *Botanical Journal of the Linnean Society*, v.158, n.1, p.51-54, 2008.
- SOARES, D. J.; PIGNITTER, M.; EHRNHÖFER-RESSLER, M. M. Identification and quantification of oxidoselinina-1,3,7(11)-trien-8-one and cyanidin-3-glucoside as one of the major volatile and non-volatile low-molecular-weight constituents in pitanga pulp. *PLoS ONE*, v.10, n.9, 2015.
- SPAGOLLA, L. C.; SANTOS, M. M.; PASSOS, L. M. L. Alcoholic extracts of total phenolics and flavonoids from rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) and their antioxidant activity. *Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada*, v.30, n.2, p.187-191, 2009.
- STARR, M.; FRANCIS, F. Effect of metallic ions on color and pigment content of cranberry juice cocktail. *Journal of Food Science*, v.38, n.6, p.1043-1046, 1973.
- STAUDT, G. Systematics and geographic distribution of the American strawberry species: Taxonomic studies in the genus *Fragaria* (Rosaceae: Potentilleae): Univ of California Press, v.81, 1999.
- STEINER, I.; KENNEDY, P. G.; PACHNER, A. R. The neurotropic herpes viruses: herpes simplex and varicella-zoster. *Lancet Neurology*, v.6, n.11, p.1015-1028, 2007.
- STONER, G. D.; KRESTY, L. A.; CARLTON, P. S. Isothiocyanates and freeze-dried strawberries as inhibitors of esophageal cancer. *Toxicological Sciences*, v.52, n.2 SUPPL., p.95-100, 1999.

- SU, M. S.; CHIEN, P. J. Antioxidant activity, anthocyanins, and phenolics of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) fluid products as affected by fermentation. *Food Chemistry*, v.104, n.1, p.182-187, 2007.
- SU, M. S.; CHIEN, P. J. Aroma impact components of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) vinegars. *Food Chemistry*, v.119, n.3, p.923-928, 2010.
- SUBASH, S.; ESSA, M.M.; AL-ADAWI, S.; MEMON, M.A.; MANIVASAGAM, T.; AKBAR, M. Neuroprotective effects of berry fruits on neurodegenerative diseases. *Neural Regen. Res.* 9 (16), 1557–1566, 2014.
- SUBRAMANIAM, M.; ABDIN, E.; VAINGANKAR, J.A.; NAN, L.; HENG, D.; MCCRONE, P.; CHONG, S.A. Impact of psychiatric disorders and chronic physical conditions on health-related quality of life: Singapore Mental Health Study. *J Affect Disord.* 147(1-3):325-30, 2013.
- SUN, J.; LIN, L. Z.; CHEN, P. Study of the mass spectrometric behaviors of anthocyanins in negative ionization mode and its applications for characterization of anthocyanins and non-anthocyanin polyphenols. *Rapid Communications in Mass Spectrometry*, v.26, n.9, p.1123-1133, 2012.
- SUZUTANI, T.; OGASAWARA, M.; YOSHIDA, I. Anti-herpesvirus activity of an extract of *Ribes nigrum* L. *Phytotherapy research*, v.17, n.6, p.609-613, 2003.
- TAKIKAWA, M.; INOUE, S.; HORIO, F. Dietary anthocyanin-rich bilberry extract ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity via activation of amp-activated protein kinase in diabetic mice. *Journal of Nutrition*, v.140, n.3, p.527-533, 2010.
- TANAKA, Y.; BRUGLIERA, F.; CHANDLER, S. Recent progress of flower colour modification by biotechnology. *International Journal of Molecular Sciences*, v.10, n.12, p.5350-5369, 2009.
- TANG, S. Y.; HALLIWELL, B. Medicinal plants and antioxidants: What do we learn from cell culture and *Caenorhabditis elegans* studies? *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v.394, n.1, p.1-5, 2010.
- TIMM, L. C.; TAVARES, V. E. Q.; REISSER, C. Morangueiro irrigado: aspectos técnicos e ambientais do cultivo: Ed. da Universidade Federal de Pelotas, 2009.



TSUDA, T.; HORIO, F.; UCHIDA, K. Dietary cyanidin 3-O- $\beta$ -D-glucoside-rich purple corn color prevents obesity and ameliorates hyperglycemia in mice. *Journal of Nutrition*, v.133, n.7, p.2125-2130, 2003.

TULIPANI, S.; MEZZETTI, B.; BATTINO, M. Impact of strawberries on human health: Insight into marginally discussed bioactive compounds for the Mediterranean diet. *Public Health Nutrition*, v.12, n.9 SPEC. ISSUE 9A, p.1656-1662, 2009.

UBOGU, E. E.; COSSOY, M. B.; RANSOHOFF, R. M. The expression and function of chemokines involved in CNS inflammation. *Trends Pharmacol Sci*, v. 27, n. 1, p. 48-55, 2006.

VALVASSORI, S.S.; REZIN, G.T.; FERREIRA, C.L.; MORETTI, M.; GONÇALVES, C.L.; CARDOSO, M.R.; STRECK, E.L.; KAPCZINSKI, F.; QUEVEDO, J. Effects of mood stabilizers on mitochondrial respiratory chain activity in brain of rats treated with d-amphetamine. *J Psychiatr Res*. 44(14):903-9, 2010.

VEBERIC, R.; SLATNAR, A.; BIZJAK, J. Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *LWT - Food Science and Technology*, v.60, n.1, p.509-517, 2015.

VERNIN, G.; VERNIN, C.; PIERIBATTESTI, J. C. Analysis of the Volatile Compounds of *Psidium cattleianum* Sabine Fruit from Reunion Island. *Journal of Essential Oil Research*, v.10, n.4, p.353-362, 1998.

VIZZOTTO, M.; DA ROSA FETTER, M.; CORBELINI, D. D. Bioactive compounds and antioxidant activity of blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). *Acta Horticulturae*. MAHAPATRA, S. C.; AGRAWAL, V. 972: 111-116 p. 2013.

WANG, S. Y.; MILLNER, P. Effect of different cultural systems on antioxidant capacity, phenolic content, and fruit quality of strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.57, n.20, p.9651-7, 2009.

WANG, S. Y.; CHEN, H.; EHLENFELDT, M. K. Antioxidant capacities vary substantially among cultivars of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). *International Journal of Food Science and Technology*, v.46, n.12, p.2482-2490, 2011a.

WANG, S. Y.; CHEN, H.; EHLENFELDT, M. K. Variation in antioxidant enzyme activities and nonenzyme components among

cultivars of rabbiteye blueberries (*Vaccinium ashei* Reade) and *V. ashei* derivatives. Food Chemistry, v.129, n.1, p.13-20, 2011b.

WANG, Z. Y.; FAN, Z. L.; ZHANG, H. Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected berries extract from china's northeast region. 6th International CIGR Technical Symposium - Towards a Sustainable Food Chain: Food Process, Bioprocessing and Food Quality Management. Nantes, 2011.

WANG, S. Y.; CAMP, M. J.; EHLENFELDT, M. K. Antioxidant capacity and  $\alpha$ -glucosidase inhibitory activity in peel and flesh of blueberry (*Vaccinium* spp.) cultivars. Food Chemistry, v.132, n.4, p.1759-1768, 2012.

WANG, S. Y.; CHEN, H.; CAMP, M. J. Flavonoid constituents and their contribution to antioxidant activity in cultivars and hybrids of rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade). Food Chemistry, v.132, n.2, p.855-864, 2012a.

WANG, S. Y.; CHEN, H.; CAMP, M. J. Genotype and growing season influence blueberry antioxidant capacity and other quality attributes. International Journal of Food Science and Technology, v.47, n.7, p.1540-1549, 2012b.

WANG, Y.C.; WANG, E.N.; WANG, C.C.; HUANG, C.L.; HUANG, A.C. Effects of lithium and carbamazepine on spatial learning and depressive behavior in a rat model of bipolar disorder induced by ouabain. Pharmacol. Biochem. Behav. 105, 118–127, 2013.

WEAVER, J.; BRISCOE, T.; HOU, M. Strawberry polyphenols are equally cytotoxic to tumourigenic and normal human breast and prostate cell lines. International Journal of Oncology, v.34, n.3, p.777-786, 2009.

WOJDYŁO, A.; FIGIEL, A.; OSZMIANŚKI, J. Effect of drying methods with the application of vacuum microwaves on the bioactive compounds, color, and antioxidant activity of strawberry fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.57, n.4, p.1337-1343, 2009.

WOJDYŁO, A.; OSZMIANŚKI, J.; BOBER, I. The effect of addition of chokeberry, flowering quince fruits and rhubarb juice to strawberry jams on their polyphenol content, antioxidant activity and colour. European Food Research and Technology, v.227, n.4, p.1043-1051, 2008.

WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of

normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, n.11, p.4069-4075, 2006.

YAMAGUCHI, H.; WYCKOFF, J.; CONDEELIS, J. Cell migration in tumors. *Current Opinion in Cell Biology*, v.17, n.5 SPEC. ISS., p.559-564, 2005.

YEH, C. T.; YEN, G. C. Induction of apoptosis by the anthocyanidins through regulation of Bcl-2 gene and activation of c-Jun N-terminal kinase cascade in hepatoma cells. *Journal of agricultural and food chemistry*, v.53, n.5, p.1740-1749, 2005.

YILDIZ, O.; EYDURAN, S. P. Functional components of berry fruits and their usage in food technologies. *African Journal of Agricultural Research*, v.4, n.5, p.422-426, 2009.

YOUNG, J. W. DULIS, D. Investigating the mechanism(s) underlying switching between states in bipolar disorder. *European Journal of Pharmacology*. 759, 151-162, 2015.

ZAFRA-STONE, S.; YASMIN, T.; BAGCHI, M. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. *Molecular Nutrition and Food Research*, v.51, n.6, p.675-683, 2007.

ZHANG, Y.; SEERAM, N. P.; LEE, R. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.56, n.3, p.670-675, 2008.

ZHAO, C.-L.; YU, Y.-Q.; CHEN, Z.-J. Stability-increasing effects of anthocyanin glycosyl acylation. *Food Chemistry*, v.214, p.119-128, 2017.

ZHU, H.; CHEN, M.; WEN, Q. Isolation and characterization of the carotenoid biosynthetic genes LCYB, LCYE and CHXB from strawberry and their relation to carotenoid accumulation. *Scientia Horticulturae*, v.182, p.134-144, 2015.



## **CAPITULO 2 - CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS POTENCIAIS ATIVIDADES DE CAPTAÇÃO DE RADICAIS LIVRES, CITOTÓXICA E ANTIVIRAL DE FRUTOS VERMELHOS CULTIVADOS NO SUL DO BRASIL**

### **2.1 INTRODUÇÃO**

Os frutos vermelhos apresentam inúmeras potenciais atividades farmacológicas, sendo as as mais descritas na literatura as ações anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante, antiviral e antiproliferativa (JOSINO SOARES et al., 2014; CARVALHO et al., 2012; ALVAREZ-SUAREZ et al., 2011; CARLTON et al., 2001).

Muitos frutos vermelhos apresentam cultivo mundialmente difundido, o que faz com que apresentem perfis químicos razoavelmente caracterizados, como é o caso dos pseudofrutos de morango, e dos frutos de mirtilo e amora-preta (HE et al., 2016; VEBERIC et al., 2015; DIAZ-GARCIA e CASTELLAR, 2011; WU et al., 2006). Por outro lado, frutos cultivados regionalmente, como os frutos de pitanga e araçá, também objetos de estudo do presente trabalho, apresentam uma caracterização química menos detalhada (DENARDIN et al., 2015; SOARES et al., 2015; BIEGELMEYER et al., 2011).

Considerando as informações sobre potenciais atividades farmacológicas e caracterização química de frutos com cultivo regional, ou mesmo a inexistência de estudos que descrevam esses dados em frutos com origem e cultivo restritos ao Brasil, o presente capítulo descreve a caracterização química de frutos vermelhos cultivados no sul do Brasil e a avaliação das potenciais atividades citotóxica, antiviral e da capacidade em captar radicais livres dos extratos de frutos de *Eugenia uniflora*, *Fragaria x ananassa*, *Psidium cattleianum*, *Rubus* sp. e *Vaccinium virgatum*.

As seções de material e métodos, assim como a de resultados e discussão deste capítulo estão apresentadas em forma de artigo científico.

### **2.2 OBJETIVOS**

#### **2.2.1 Objetivo geral**

Avaliar a composição química e as potenciais atividades anti-herpética e citotóxica, a capacidade de captação de radicais livres, dos extratos de frutos de *Eugenia uniflora*, *Fragaria x ananassa*, *Psidium*

*catlleianum*, *Rubus* sp. e *Vaccinium virgatum* e suas respectivas frações enriquecidas em antocianinas.

### 2.2.2 Objetivos específicos

- Determinar os teores de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas totais nos extratos de frutos de *Eugenia uniflora*, *Fragaria x ananassa*, *Psidium catlleianum*, *Rubus* sp. e *Vaccinium virgatum*.
- Desenvolver metodologia analítica por CLAE/DAD/EM/EM para a identificação e quantificação das antocianinas presentes nos extratos dos frutos citados.
- Avaliar a potencial atividade anti-herpética *in vitro* dos extratos pelo ensaio de redução do número das placas de lise.
- Avaliar a potencial citotoxicidade *in vitro* dos extratos frente a três linhagens celulares tumorais humanas pelo ensaio da sulforodamina B.
- Avaliar a potencial capacidade de captação de radicais livres *in vitro* dos extratos pelos ensaios dos radicais DPPH e ABTS.

## 2.3 PUBLICAÇÃO - BERRIES GROWN IN BRAZIL: ANTHOCYANINS PROFILES AND BIOLOGICAL PROPERTIES

RUNNING TITLE: CHEMICAL COMPOSITION OF BERRIES  
GROWN IN BRAZIL

**Vitor C. Chaves**<sup>a,b,1</sup>, **Laurita Boff**<sup>a,2</sup>, **Márcia Vizzotto**<sup>c</sup>, **Eunice Calvete**<sup>d</sup>, **Flávio H. Reginatto**<sup>b,2</sup>, **Cláudia M. O. Simões**<sup>a,b,1,2\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratório de Virologia Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia & Biociências, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

<sup>c</sup> Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (EMBRAPA) Pelotas, RS, Brazil

<sup>d</sup> Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de Passo Fundo, UPF, Passo Fundo, RS, Brazil

<sup>1</sup>Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia & Biociências

<sup>2</sup>Programa de Pós-Graduação em Farmácia

\* Author to whom correspondence should be addressed, e-mail: claudia.simoes@ufsc.br

Manuscrito publicado no *Journal of the Science of Food and Agriculture*

This article has been accepted for publication and undergone full peer review but has not been through the copyediting, typesetting, pagination and proofreading process, which may lead to differences between this version and the Version of Record. Please cite this article as doi: 10.1002/jsfa.8959

## ABSTRACT

**Background:** The phytochemical profiles of two Brazilian native fruits, *pitanga* (red and purple) and *araçá* (yellow and red), as well as strawberry cultivars Albion, Aromas, and Camarosa, blackberry cultivar Tupy, and blueberry cultivar Bluegen cultivated in Brazil were characterized and quantified by liquid chromatography coupled to a photodiode array and a quadrupole-time of flight mass spectrometry detector. **Results:** Among these fruits, blueberry presented the highest total anthocyanin content (1202 mg equivalent of cyanidin-O-glucoside kg<sup>-1</sup> fresh fruit), while strawberry cultivar Aromas presented the highest total phenolic content (13550 mg equivalent of gallic acid kg<sup>-1</sup> fresh fruit). For *pitanga* fruit the presence of eight anthocyanins, which had not been previously described in this species, were detected. *Araçá* fruit showed, the lowest total anthocyanin content compared to the other berries tested, and cyanidin-O-glucoside was identified for the first time in this fruit. No relevant cytotoxicity against three cancer cell lines or antiherpes activity was detected at the experimental conditions tested. **Conclusion:** Total anthocyanin content of all fruits had a strong positive correlation with their free radical scavenging activity suggesting the anthocyanin contribution to the antioxidant potential of these fruits.

**Keywords:** Berries. Anthocyanins. LC/PDA/Q-TOF-MS. *Eugenia uniflora*. *Psidium cattleianum*.



## INTRODUCTION

Berries constitute a large group of functional foods whose consumption has demonstrated a broad spectrum of positive effects in human health including those in cardiovascular disorders, inflammatory conditions, metabolic syndrome, as well as distinct degenerative diseases. These effects have been related to specific phytochemicals, mainly phenolic compounds, such as phenolic acids, tannins, and anthocyanins, the major compounds present in berries, which also improve neuronal and cognitive brain functions and protect genomic DNA integrity<sup>1,2</sup>.

Anthocyanins constitute the largest and likely the most important group of water-soluble plant pigments, which are responsible for the blue, purple, and red color of diverse tissues. Anthocyanins have a flavilium cation as core structure with different sugars attached at position C3. Epidemiological data suggest a direct correlation between anthocyanin intake and low incidence of chronic and degenerative diseases, and anthocyanins also present a promising alternative to synthetic food dyes<sup>3,4</sup>.

Recently, the cultivation of certain berries in Brazil has expanded, especially in subtropical areas, and is accompanied by an increase in consumption of blueberries (*Vaccinium virgatum* A.), strawberries (*Fragaria x ananassa* Duch.) and blackberries (*Rubus* sp.), as well as native Brazilian berries, such as "pitanga" (*Eugenia uniflora* L.) and "araçá" (*Psidium cattleianum* S.)<sup>5-8</sup>.

The investigation of anthocyanin composition of berries is relevant since it can be influenced by several factors, such as geographical location, temperature, and cultivation parameters<sup>9</sup>. Therefore, considering the limited number of investigations related to the chemical content of both Brazilian wild berries cited above, the present study aimed to characterize the anthocyanin profiles of different berries grown in Brazil. In addition, their antioxidant potential, antiherpes effects as well as their cytotoxicity against human cancer cell lines were evaluated.

## MATERIALS AND METHODS

### Plant material

Fruit of red and purple varieties of *Eugenia uniflora* (pitanga), yellow and red varieties of *Psidium cattleianum* (araçá), *Rubus* sp.

(blackberry) cultivar Tupy, and *Vaccinium virgatum* (blueberry) cultivar Bluegen were cultivated at Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (EMBRAPA) in Pelotas, RS, Brazil (31°40'50.6"S; 52°26'23.1"W). *Fragaria x ananassa* (strawberry) cultivars Albion, Aromas, and Camarosa were cultivated at the *Universidade de Passo Fundo* in Passo Fundo, RS, Brazil (28°13'58.5"S; 52°23'00.7"W). After harvesting, fruits were stored at -20 °C until extraction and analyses.

### **Extraction procedures**

Extracts of all fruits were prepared by sonication (Ultrasonic Cleaner 1450, Unique) using 1 g of frozen fruits milled in a electric blender (LAR4, METVISA, Brazil) and 60 mL of methanol for 50 min at room temperature (23°C ±2). Extracts were filtered in qualitative filter paper (particle retention: 4 – 12 µm) and concentrated to dryness under reduced pressure yielding the crude extracts. Each extract was then solubilized in distilled water (30 mL), then freeze-dried and stored at -20°C and after these subjected to a lyophilization process. All extracts were stored not more than 60 days before phytochemical analyses and biological assays. All extractions were performed in triplicate.

### **LC/PDA/Q-TOF-MS analyses of anthocyanins**

Anthocyanins were individually identified and quantified by ultra performance liquid chromatography (Acquity-UPLC™) coupled to a photodiode array detector (PDA) and a high-resolution mass spectrometer (Xevo® G2 QToF model – WATERS®) equipped with an electrospray ionization source (ESI) operating in positive mode. The chromatographic separation was performed using a Synergi™ column (Phenomenex® - id 4 µm, 150 x 2.0 mm) at 40 °C and the injection volume was set at 5 µL. The elution was performed using an aqueous phase consisting of formic acid 2% (solvent A) and acetonitrile containing 1% of formic acid (solvent B). A linear gradient according the following conditions was used: 0-10 min, 5-12% B; 10-29 min, 12-18% B; 29-33 min, 18% B; 33-34 min, 5% B with a constant flow of 0.4 mL.min<sup>-1</sup>. The detection was performed at 520 nm, and the range of spectral scanning in the visible region ranged from 450 to 600 nm (PDA). Mass scanning ranged from *m/z* 200 to 1500 with a scan time of 0.5 s. MS/MS analyses were performed using a collision energy ramp (10 – 30 eV) with argon as

the collision gas. The capillary voltage of 1.0 kV, source block temperature of 120 °C, desolvation temperature of 600 °C; nebulizer nitrogen flow rate of 80 L.h<sup>-1</sup>, desolvation nitrogen gas flow of 800 L.h<sup>-1</sup>, and cone voltage of 40 V were used controlled by MassLynx v.4.1 software for data acquisition and processing. All samples were analyzed in triplicate, the methodology was validated, and specificity, linearity, accuracy, precision, and detection and quantitation limits were measured.

### **Total phenolic content (TPC)**

Total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu assay<sup>10</sup>. Samples and standards were analyzed in triplicate and the results expressed as milligrams of gallic acid equivalent per gram of fresh fruit (mg GAE g<sup>-1</sup> FF). A gallic acid standard curve was prepared with concentrations ranging from 60 to 300 µg mL<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.998).

### **Total anthocyanin content (TAC)**

The determination of total monomeric anthocyanin content was performed using the pH differential method<sup>11</sup> at two wavelengths (520 and 700 nm). The molar absorptivity coefficient ( $\epsilon$ ) used for cyanidin-3-*O*-glucoside in a methanol solution was 26600 L/M/cm. Results were expressed as cyanidin-3-*O*-glucoside equivalents in mg per 100 g of fresh fruit (mg CGE 100 g<sup>-1</sup> FF).

### **Radical scavenging assays**

#### *DPPH assay*

Free DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical scavenging activity was assayed as previously described by Sánchez-Moreno et al.,<sup>12</sup>. Briefly, 100 mL of five different concentrations of each sample were added to 3.9 mL of a methanol solution of DPPH (60 µM). After 60 min, absorbance was measured at 515 nm (Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer®). Each sample was analyzed in triplicate, and the concentration of each extract that reduced 50% of DPPH concentration (EC<sub>50</sub>) was expressed as mg mL<sup>-1</sup>.

### *ABTS assay*

Free ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)] radical scavenging activity was assayed using the method previously described<sup>13</sup>. Briefly, the ABTS radical was produced by mixing ABTS diammonium salt (7 mM) and potassium persulfate (2.5 mM). After 16 h, the radical produced was diluted to produce a solution with an absorbance of 0.7 at 734 nm. Finally, 10  $\mu$ L of five different concentrations of each sample were added to 1 mL of ABTS radical solution. After 5 min, absorbance was measured at 734 nm (Lambda 25 UV/Vis, PerkinElmer®). Each sample was analyzed in triplicate, and the concentration of each extract that reduced 50% of ABTS concentration ( $EC_{50}$ ) was expressed as mg mL<sup>-1</sup>.

### **Cytotoxicity screening**

Cytotoxic screening was conducted with three human cancer cell lines: A549 (non-small cell lung cancer cells, ATCC: CCL-185), RD (rhabdomyosarcoma, Instituto Adolfo Lutz, SP, Brazil), and DU145 (prostate carcinoma, DSMZ, ACC 261, Braunschweig, Germany). A549 and RD cells were cultivated in Eagle's minimum essential medium (MEM, Gibco, Carlsbad, CA, USA), and DU145 cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, with high glucose and 1% L-glutamine, Gibco). All cell lines were supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco) and maintained at 37°C and 5% CO<sub>2</sub> in a humidified atmosphere. Cytotoxic screening was performed by the sulforhodamine B (SRB) assay<sup>14</sup>. Each cell line was exposed to different concentrations of the crude fruit extracts for 48 h. Paclitaxel (Sigma-Aldrich) was used as positive control. The 50% cytotoxic concentration ( $CC_{50}$ ) was defined as the concentration that reduced cell viability by 50% when compared to untreated controls, and was determined for each sample in triplicate.

### **Antiherpes screening**

Two tests for determining antiherpes activity of fruit crude extracts were performed. First, the cytotoxicity of the extracts on Vero cells (ATCC: CCL81) was evaluated using the sulforhodamine B (SRB) assay as described above. These cells were grown in MEM supplemented with 10% FBS at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub> for 24h, and exposed to different

concentrations of the extracts for 48 h. The 50% cytotoxic concentration (CC<sub>50</sub>) of each sample was defined as the concentration that reduced Vero cell viability by 50% when compared to untreated controls. Second, the potential antiherpes (anti-HSV-1) activity was screened by plaque number reduction assay as described previously<sup>15</sup>. Vero cells were infected with approximately 100 PFU of HSV-1 (KOS strain - acyclovir sensitive, Faculty of Pharmacy, University of Rennes I, Rennes, France) for 1 h at 37 °C. The fruit extracts were added at non-cytotoxic concentrations after viral infection. Then, cells were washed with PBS, overlaid with MEM containing 5% carboxymethylcellulose (Sigma-Aldrich) in the presence or absence of different concentrations of the fruit extracts, and incubated for 48 h. Cells were fixed and stained with naphthol blue-black (Sigma-Aldrich) and viral plaques were counted using a stereomicroscope. The concentration of each extract that inhibited viral replication by 50% (IC<sub>50</sub>) when compared to untreated controls was determined. Acyclovir (ACV, Sigma-Aldrich) was used as positive control.

### **Data analysis**

Statistical analyses were conducted using Graphpad Prism 6 software, The analysis of variance (ANOVA) was used to test differences among samples. Newman-Keuls multiple range test was used to verify. Pearson's correlation was used to determine whether there was a statistically significant relationship between two variables. Data are presented as means ± standard deviations.

## **3. RESULTS AND DISCUSSION**

### **3.1. Anthocyanin identification**

The identification of anthocyanins was initially established by the presence of a characteristic absorption band at wavelengths ranging from 500 to 550 nm in the visible region of the electromagnetic spectra<sup>16</sup>. Identification of anthocyanins was based on MS/MS spectra and exact mass. MS data showed seven types of anthocyanins: those derived from pelargonidin (*m/z* 271), cyanidin (*m/z* 287), peonidin (*m/z* 301),

delphinidin ( $m/z$  303), petunidin ( $m/z$  317), malvidin ( $m/z$  331), and carboxypyranpelargonidin ( $m/z$  339). The sugar moiety was determined by MS/MS fragmentation spectra and by the elution order of anthocyanins. As previously described, glucose and galactose were the predominant sugars attached to the identified anthocyanins<sup>17</sup>. To confirm the identification, the exact mass and the spectra obtained were compared to those of MassBank® (<https://www.massbank.jp>) and Metlin® (<https://metlin.scripps.edu>) databases. Twenty one anthocyanins were detected in the fruits herein investigated, of which eight were detected for the first time in the respective species: delphinidin-*O*-galactoside, cyanidin-*O*-galactoside, petunidin-*O*-galactoside, pelargonidin-3-*O*-glucoside, malvidin-*O*-galactoside, malvidin-*O*-pentoside, and malvidin-*O*-acetylhexoside in *pitanga* fruits; and cyanidin-3-*O*-glucoside in *araçá* fruits..

*Pitangueira* is a native plant from Brazil that produces purple or red colored fruit called *pitanga*. The LC/PDA/Q-TOF-MS of *pitanga* fruit showed eleven different anthocyanins (Table 1), and among these only cyanidin-*O*-glucoside (**5**)<sup>18,19</sup>, delphinidin-*O*-glucoside (**2**)<sup>19</sup>, and one derivative of malvidin<sup>6</sup>, have been previously described for this fruit. Additionally, eight anthocyanins were identified in the red variety for the first time: delphinidin-*O*-galactoside (**1**), cyanidin-*O*-galactoside (**3**), pelargonidin-*O*-glucoside (**10**), petunidin-*O*-galactoside (**11**), pelargonidin-*O*-rutinoside (**13**), malvidin-*O*-galactoside (**15**), malvidin-*O*-pentoside (**20**), and malvidin-*O*-acetylhexoside (**21**). Four anthocyanins were identified in the purple *pitanga* variety and two of them, cyanidin-*O*-glucoside (**5**) and delphinidin-*O*-glucoside (**2**), had previously been described<sup>18,19</sup>. The other two anthocyanins found, cyanidin-*O*-galactoside (**3**) and pelargonidin-*O*-glucoside (**10**), were identified for first time in this variety.

Table 1. Anthocyanins identified in the evaluated berries

Anthocyanin	Retention time (min)	$\lambda_{max}$ (nm)	Molecular formula	[M] <sup>+</sup> <i>m/z</i> (Error - ppm)	Main fragments <i>m/z</i>	Fruit berries
(1) Delphinidin- <i>O</i> -galactoside	6.17	507	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	465.1060 (5.8)	303	Red and purple <i>Pitanga</i> ; Blueberry
(2) Delphinidin- <i>O</i> -glucoside	6.69	507	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	465.1060 (5.8)	303	Red and purple <i>Pitanga</i> ; Blueberry
(3) Cyanidin- <i>O</i> -galactoside	7.70	515	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	449.1065 (-4.2)	287	Red and purple <i>Pitanga</i> ; Blackberry; Blueberry
(4) Delphinidin- <i>O</i> -pentoside	7.84	505	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	435.0892 (3.0)	303	Blueberry
(5) Cyanidin- <i>O</i> -glucoside	8.49	515	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	449.1065 (-4.2)	287	Red and purple <i>Pitanga</i> ; yellow and red <i>Araçá</i> ; Strawberry cv. Albion, Aromas and Camarosa; Blackberry, Blueberry
(6) Petunidin- <i>O</i> -galactoside	8.95	522	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	479.1161 (-6.1)	317	Blueberry, red <i>Pitanga</i>
(7) Cyanidin- <i>O</i> -rutinoside	9.14	517	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>15</sub> <sup>+</sup>	595.1705 (7.1)	449	Blackberry
(8) Petunidin- <i>O</i> -glucoside	9.59	522	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	479.1161 (1.1)	317	Blueberry
(9) Cyanidin- <i>O</i> -pentoside	9.64	517	C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> O <sub>10</sub> <sup>+</sup>	419.0931 (-4.7)	287	Blueberry
(10) Pelargonidin- <i>O</i> -glucoside	10.29	500	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub> <sup>+</sup>	433.1130 (1.2)	271	Red and purple <i>Pitanga</i> ; Strawberry cv. Albion, Aromas and Camarosa; Blackberry
(11) Peonidin- <i>O</i> -galactoside	10.86	517	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	463.1215 (-5.4)	301	Blueberry
(12) Petunidin- <i>O</i> -pentoside	10.86	517	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	449.1087 (-0.1)	317	Blueberry
(13) Pelargonidin- <i>O</i> -rutinoside	11.09	500	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>14</sub> <sup>+</sup>	579.1721 (1.2)	433; 271	Strawberry cv. Albion, Aromas and Camarosa
(14) Peonidin- <i>O</i> -glucoside	11.76	517	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	463.1215 (-5.4)	301	Blueberry
(15) Malvidin- <i>O</i> -galactoside	11.88	530	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	493.1326 (-4.1)	331	Red <i>Pitanga</i> ; Blueberry
(16) Malvidin- <i>O</i> -glucoside	12.69	530	C <sub>23</sub> H <sub>25</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	493.1326 (-4.1)	331	Blueberry
(17) Cyanidin- <i>O</i> -malonylhexoside	12.87	518	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> O <sub>14</sub> <sup>+</sup>	535.1062 (-4.9)	449; 287	Blackberry
(18) Carboxypyranpelargonidin- <i>O</i> -hexoside	13.00	495	C <sub>24</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub> <sup>+</sup>	501.1014 (-3.8)	339	Strawberry cv. Albion, Aromas and Camarosa
(19) Peonidin- <i>O</i> -pentoside	13.03	515	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub> <sup>+</sup>	433.1101 (-7.9)	301	Blueberry
(20) Malvidin- <i>O</i> -pentoside	14.22	522	C <sub>23</sub> H <sub>23</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	463.1207 (-7.1)	331	Red <i>Pitanga</i> ; Blueberry
(21) Malvidin- <i>O</i> -acetylhexoside	20.29	528	C <sub>23</sub> H <sub>27</sub> O <sub>13</sub> <sup>+</sup>	535.1425 (-5.0)	331	Red <i>Pitanga</i>

In relation to *araçá* fruit, only one cyanidin derivative has been previously described<sup>20</sup>. In the current study, only cyanidin-*O*-glucoside (**5**) was identified in both *araçá* varieties. To the best of our knowledge, this compound was described here for the first time.

Another berry analyzed in this study was blackberry, a species more widely cultivated than *pitanga* or *araçá*. The anthocyanin profile of blackberries has been widely described and encompasses twelve anthocyanin derivatives of cyanidin, peonidin, pelargonidin, and malvidin<sup>21</sup>. In the present study, four anthocyanins were identified in blackberry cultivar Tupy: cyanidin-*O*-galactoside (**3**), cyanidin-*O*-glucoside (**5**), cyanidin-*O*-rutinoside (**7**), and pelargonidin-*O*-glucoside (**10**), which is in agreement with previous reports for this fruit<sup>21</sup>.

Three strawberries cultivars (Camarosa, Aromas, and Albion) were also investigated and cyanidin-*O*-glucoside (**5**), pelargonidin-*O*-glucoside (**10**), pelargonidin-*O*-rutinoside (**13**), and carboxypyranopelargonidin-*O*-hexoside (**18**) have been previously described in cultivars of *Fragaria x ananassa*<sup>22,23</sup>.

Although the production of blueberries is more restricted to the northern hemisphere, the berries evaluated here were cultivated in Southern Brazil. As previously described<sup>24,25</sup>, blueberries presented the highest anthocyanin content in comparison to the other fruits examined here. As expected according to the LC/MS analyses, blueberries showed the highest anthocyanin complexity among all berry fruits herein investigated, with 15 anthocyanins identified: delphinidin-*O*-galactoside (**1**), delphinidin-*O*-glucoside (**2**), cyanidin-*O*-galactoside (**3**), delphinidin-*O*-pentoside (**4**), cyanidin-*O*-glucoside (**5**), petunidin-*O*-galactoside (**6**), petunidin-*O*-glucoside (**8**), cyanidin-*O*-pentoside (**9**), peonidin-*O*-galactoside (**11**), petunidin-*O*-pentoside (**12**), peonidin-*O*-glucoside (**14**), malvidin-*O*-galactoside (**15**), malvidin-*O*-glucoside (**16**), peonidin-*O*-pentoside (**19**), and malvidin-*O*-pentoside (**20**). All compounds have been previously described in blueberry<sup>24,25</sup>.

Finally, it is important to emphasize that among all anthocyanins identified, only cyanidin-*O*-glucoside (**5**) was present in all nine berry extracts analyzed.

## Quantification of individual anthocyanins

All anthocyanins identified in fruit extracts were also quantified individually by UPLC-PDA-ESI-MS. The methodology was validated



according to ICH guidelines (2005)<sup>28</sup> using cyanidin-3-*O*-glucoside as analytical standard, and the parameters evaluated were accuracy, precision, specificity, linearity, and limits of detection and quantification (Table 2). Among the fruits analyzed it was possible to determine the presence of one major anthocyanin in each fruit berry with the exception of blueberry cultivar Bluegen.

**Table 2.** Parameters of the validated analytical methods for high performance liquid chromatography detected by mass spectrometry for quantification of all anthocyanins expressed in cyanidin-3-*O*-glucoside.

Compound	Precision			Accuracy		LOQ <sup>b</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	LOD <sup>c</sup> ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Linearity (R <sup>2</sup> )
	Repeatability		Intermediate precision	Mean (%)	SDR <sup>a</sup> (%)			
	Concentration ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	SDR (%)	SDR (%)					
Cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside	0.04	5.5	5.0	105.0	4	0.02	0.01	0,998
	3.12	3.5	3.8					
	25.00	3.0	3.2					

<sup>a</sup>Standard deviation relative (SDR); <sup>b</sup> Limit of quantification (LOQ); <sup>c</sup> Limit of detection (LOD).

Cyanidin-*O*-glucoside represented 45% and 80% of TAC in red and purple *pitanga* varieties, respectively (Table 3). In blackberries, cyanidin-*O*-galactoside represented more than 90% of TAC. All strawberry cultivars presented pelargonidin-*O*-glucoside as the predominant anthocyanin with 85% of TAC. Blueberry fruit showed the highest complex mixture of anthocyanins and the highest TAC, but they did not show one major anthocyanin compound.

**Table 3.** Individual anthocyanin content of the evaluated berries

<b>Anthocyanin</b>	<b>Red <i>Pitanga</i></b>	<b>Purple <i>Pitanga</i></b>	<b>Yellow <i>Araçá</i></b>	<b>Red <i>Araçá</i></b>	<b>Strawberry cv. Camarosa</b>	<b>Strawberry cv. Aromas</b>	<b>Strawberry cv. Albion</b>	<b>Blackberry cv. Tupy</b>	<b>Blueberry cv. Bluegen</b>
(1) Delphinidin- <i>O</i> -galactoside	3.2 ± 0.13	80.9 ± 3.48	nd	nd	nd	nd	nd	nd	265.2 ± 13.26
(2) Delphinidin- <i>O</i> -glucoside	1.1 ± 0.05	0.9 ± 0.04	nd	nd	nd	nd	nd	nd	22.9 ± 1.05
(3) Cyanidin- <i>O</i> -galactoside	9.1 ± 0.46	41.0 ± 2.05	nd	nd	nd	nd	nd	2.9 ± 0.12	49.6 ± 2.38
(4) Delphinidin- <i>O</i> -pentoside	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	113.6 ± 4.66
(5) Cyanidin- <i>O</i> -glucoside	69.1 ± 3.32	582.9 ± 22.73	0.4 ± 0.02	11.7 ± 0.60	2.3 ± 0.1	8.2 ± 0.38	3.8 ± 0.15	797.0 ± 33.47	2.9 ± 0.11
(6) Petunidin- <i>O</i> -galactoside	7.5 ± 0.31	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	209.3 ± 10.47
(7) Cyanidin- <i>O</i> -rutinoside	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	53.9 ± 2.75	nd
(8) Petunidin- <i>O</i> -glucoside	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	6.7 ± 0.31
(9) Cyanidin- <i>O</i> -pentoside	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12.6 ± 0.54
(10) Pelargonidin- <i>O</i> -glucoside	1.1 ± 0.04	2.4 ± 0.10	nd	nd	150.8 ± 6.03	227.9 ± 11.40	222.5 ± 9.35	0.6 ± 0.02	nd
(11) Peonidin- <i>O</i> -galactoside	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	12.1 ± 0.48
(12) Petunidin- <i>O</i> -pentoside	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	67.9 ± 3.46
(13) Pelargonidin- <i>O</i> -rutinoside	nd	nd	nd	nd	19.2 ± 0.81	10.5 ± 0.41	13.8 ± 0.66	nd	nd
(14) Peonidin- <i>O</i> -glucoside	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	1.2 ± 0.06
(15) Malvidin- <i>O</i> -galactoside	37.2 ± 1.86	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	333.3 ± 13.00
(16) Malvidin- <i>O</i> -glucoside	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7.6 ± 0.31
(17) Cyanidin- <i>O</i> -malonylhexoside	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	18.0 ± 0,70	nd
(18) Carboxypyranpelargonidin- <i>O</i> -hexoside	nd	nd	nd	nd	1.1 ± 0.05	0.8 ± 0.03	0.5 ± 0.02	nd	nd
(19) Peonidin- <i>O</i> -pentoside	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	2.6 ± 0.10
(20) Malvidin- <i>O</i> -pentoside	16.3 ± 0.75	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	94.3 ± 4.34
(21) Malvidin- <i>O</i> -acetylhexoside	3.3 ± 0.14	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd

The results were expressed as mg kg<sup>-1</sup> ± standard deviation of fresh fruits.; nd - not detected

### 3.3. Total phenolic content (TPC)

The TPC values of the evaluated berries are shown in Table 4. Among *pitanga* fruits, the purple variety showed a higher TPC (11400 mg kg<sup>-1</sup>) than the red one (8280 mg kg<sup>-1</sup>). Denardin et al. (2015)<sup>6</sup> detected 7990 mg TPC per kg of fresh fruit for purple *pitanga*, while Filippi et al., (2015)<sup>29</sup> detected 19810 mg TPC per kg of fresh fruit.

The strawberry cultivar Albion presented the lowest TPC when compared to the other cultivars evaluated. The TPC in all cultivars were higher than those previously found in cultivar Camarosa (2600 mg equivalent of gallic acid per kg of fresh fruit)<sup>30</sup>; In cultivar Aromas (2100 mg equivalent of gallic acid per kg of fresh fruit)<sup>31</sup>, and in cultivar Albion (1700 mg equivalent of gallic acid per kg of fresh fruit)<sup>32</sup>.

The TPC values of *araçá* fruit were 7190 (red) and 3820 (yellow) mg kg<sup>-1</sup> fresh fruit. These results were slightly higher than those obtained by other authors who detected TPC values ranging from 5370 to 7680 mg kg<sup>-1</sup> of fresh fruit<sup>6,33,34</sup>. Furthermore, blackberry and blueberry fruits showed TPC values of 9210 and 10900 mg kg<sup>-1</sup> of fresh fruit, respectively, while purple *Pitanga*, all three cultivars of strawberries, and blueberries were the species with the highest TPC values in this study. Although phenolic compounds in berries have been shown to present relevant antioxidant capacity confirmed by several ways, such as scavenging free radicals, chelating transition metals, inhibiting prooxidant and oxidant enzymes, and preventing lipid oxidation, they are not related to biological activities herein investigated.

**Table 4.** Total phenolic (TPC) and total anthocyanin (TAC) contents of the evaluated berries.

	TPC ± SD	TAC ± SD
Red <i>Pitanga</i>	8280 ± 140 a	14.8 ± 2.2 a
Purple <i>Pitanga</i>	11400 ± 120 b	708.1 ± 6.6 b
Yellow <i>Araçá</i>	3820 ± 120 c	0.4 ± 0.1 c
Red <i>Araçá</i>	7190 ± 150 d	1.7 ± 1.8 d
Strawberry cv. Camarosa	11660 ± 200 b	173.5 ± 9.8 e
Strawberry cv. Aromas	13550 ± 230 e	247.5 ± 3.1 f
Strawberry cv. Albion	10810 ± 250 f	240.7 ± 3.2 f
Blackberry cv. Tupy	9210 ± 60 g	872.4 ± 2.9 g
Blueberry cv. Bluegen	10900 ± 250 f	1202.0 ± 7.6 h

Data are expressed  $\text{mg kg}^{-1}$  of fresh fruit  $\pm$  standard deviation, and represent the mean of three independent experiments. Different letters within each column indicate significant differences (Newman-Keuls,  $p \leq 0.05$ ).

### 3.4. Total anthocyanin content (TAC)

Purple *Pitanga* fruit showed a higher TAC when compared to the red variety. Similarly, red *araçá* fruits presented higher TAC than the yellow variety. Among the berries evaluated, it was possible to observe that blueberries ( $1200 \text{ mg kg}^{-1}$ ), blackberries ( $870 \text{ mg kg}^{-1}$ ), and purple *pitanga* ( $710 \text{ mg kg}^{-1}$ ) showed the highest TAC values (Table 4).

Anthocyanin contents of strawberry fruit cultivars Camarosa and Aromas were  $170$  and  $250 \text{ mg kg}^{-1}$  of fresh fruit, respectively, which are slightly lower than those obtained by other researchers. For instance, in previous reported TACs of  $260$  and  $300 \text{ mg kg}^{-1}$  of fresh fruit, respectively in cultivar Camarosa<sup>35,36</sup>. Similar results were found in cultivar Aromas, who found  $2157 \text{ mg kg}^{-1}$  of fresh fruit<sup>31</sup>. Many variables can explain the differences found between studies, including the distinct molar extinction coefficient values ( $\epsilon$ ) used, which can range from  $15600$  to  $31620$ <sup>16</sup>. In this work,  $\epsilon = 2600$  was used, which was calculated from our experimental data.

The completely conjugated structure of anthocyanins that allows electron delocalization results in very stable radical products, which is favorable when considering their antioxidant ability. Moreover, the degree and position of hydroxylation and methoxylation in the B ring affect their stability and reactivity, and thereby also their antioxidant action. The results herein obtained using the DPPH assay are in accordance with previous observations on the effects of hydroxylation and methoxylation in the B ring in the radical scavenging ability of anthocyanins. As previously described, the anthocyanidins that present lacking the *O*-diphenyl structure in the B ring (malvidin, pelargonidin, petunidin, and peonidin) had lower efficiency toward the DPPH radical compared to cyanidin and delphinidin<sup>37</sup>.

### 3.5. Radical scavenging assays

Berries have been shown to possess important antioxidant activity<sup>6,38,39</sup>. In this work, radical scavenging activity was measured by two standard assays (DPPH and ABTS). The results showed statistically significant differences among the fruit extracts analyzed concerning their antioxidant potential, which can be associated with their anthocyanin

contents. The highest activity in both assays was found for blueberry fruit (Table 5). On the other hand, strawberries showed the lowest antioxidant potential among the fruits examined with an  $EC_{50}$  DPPH value greater than 60 mg mL<sup>-1</sup> for all cultivars.

According to data shown in Table 5, it can be noted that the radical scavenging potential of the samples was higher when obtained by the DPPH assay than by ABTS assay. However, the results obtained by different assays are not directly comparable due to the difference in the mechanism of radical capture occurring in each assay<sup>12,13</sup>. Pearson correlation analyses for both assays and TAC showed a strong correlation ( $r_{DPPH} = 0.86$  and  $r_{ABTS} = 0.82$ ) (Figure 1), while TPC presented lower correlation coefficients with the antioxidant potential of the samples ( $r_{DPPH} = -0.04$  and  $r_{ABTS} = -0.17$ ).

Many studies have reported the relevant radical scavenging potential of berries. In one of these studies, Huang et al., (2012)<sup>39</sup> showed high antioxidant activity for strawberry, blackberry, and blueberry fruit using the DPPH and ABTS assays. Similar results were found by for blackberry, *araçá*, and *pitanga* fruit by the DPPH assay<sup>6</sup>. Yet, Arend et al., (2017)<sup>38</sup> reported a strong correlation ( $r = 0.97$ ) between TAC of strawberry concentrates and their radical scavenging potential by DPPH assay<sup>34</sup>.

**Table 5.**  $EC_{50}$  values (mg.mL<sup>-1</sup>) of berries obtained from DPPH and ABTS radical scavenging assays

Berries	DPPH ± SD	ABTS <sup>+</sup> ± SD
Red <i>Pitanga</i>	52.02 ± 0.47 a	125.70 ± 3.85 a
Purple <i>Pitanga</i>	17.76 ± 0.27 b	59.38 ± 2.09 b
Yellow <i>Araçá</i>	49.26 ± 0.79 c	91.94 ± 1.02 c
Red <i>Araçá</i>	60.11 ± 2.36 d	141.00 ± 2.80 e
Strawberry cv. Camarosa	60.45 ± 1.08 d	95.96 ± 5.99 d
Strawberry cv. Aromas	65.06 ± 0.30 e	114.10 ± 2.72 d
Strawberry cv. Albion	63.60 ± 0.86 e	125.97 ± 1.37 a
Blackberry cv. Tupy	16.84 ± 0.50 b	58.84 ± 1.20 b
Blueberry cv. Bluegen	9.82 ± 0.48 f	49.97 ± 5.11 f
Gallic acid	0.03 ± 0.005 g	0.03 ± 0.004 g

Data represent the mean of three independent experiments ± standard deviation. Different letters within each column indicate significant differences (Newman-Keuls,  $p \leq 0.05$ )

According to data shown in Table 5, it can be noted that the radical scavenging potential of the samples was higher when obtained by the DPPH assay than by ABTS assay. However, the results obtained by different assays are not directly comparable due to the difference in the mechanism of radical capture occurring in each assay<sup>12,13</sup>. Pearson correlation analyses for both assays and TAC showed a strong correlation ( $r_{\text{DPPH}} = 0.86$  and  $r_{\text{ABTS}} = 0.82$ ) (Figure 1), while TPC presented lower correlation coefficients with the antioxidant potential of the samples ( $r_{\text{DPPH}} = -0.04$  and  $r_{\text{ABTS}} = -0.17$ ).

Many studies have reported the relevant radical scavenging potential of berries. In one of these studies, Huang et al., (2012)<sup>39</sup> showed high antioxidant activity for strawberry, blackberry, and blueberry fruit using the DPPH and ABTS assays. Similar results were found by for blackberry, *araçá*, and *pitanga* fruit by the DPPH assay<sup>6</sup>. Yet, Arend et al., (2017)<sup>38</sup> reported a strong correlation ( $r = 0.97$ ) between TAC of strawberry concentrates and their radical scavenging potential by DPPH assay<sup>34</sup>.

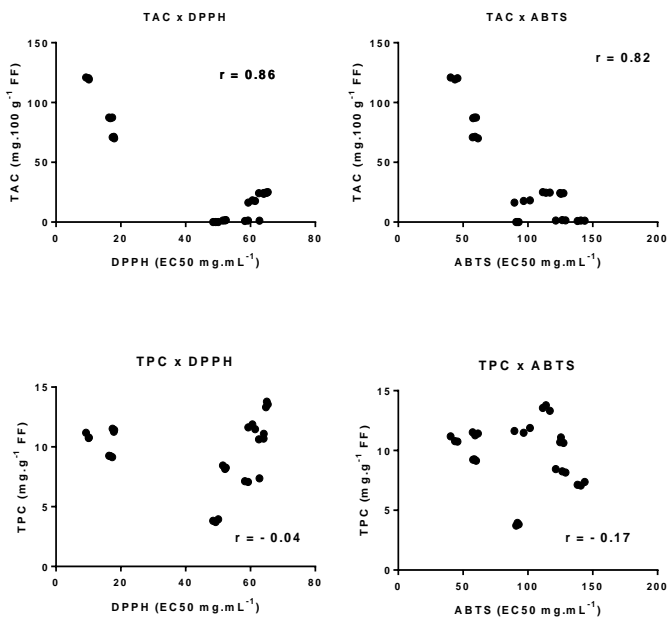


Figure 1- Pearson's correlation between TAC and TPC with DPPH and ABTS for nine berry extracts

### 3.6. Cytotoxicity against human cancer cell lines

All dried berry methanolic extracts, when evaluated at the maximum concentration of  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$ , were unable to reduce cell viability by 50% ( $\text{CC}_{50}$ ) in all tested cancer cell lines. These results corroborate those obtained by Elisia et al., (2008), who showed no cytotoxic effects for blackberry extracts ( $0.1$  to  $10 \text{ mg mL}^{-1}$ ) against human cancer cell lines LNCaP, MCF7, and MDA-MB-453<sup>40</sup>. In addition, Kulisic-Bilusic et al., (2009) also detected no cytotoxic effects for strawberry extracts ( $0.5$  to  $2 \text{ mg mL}^{-1}$ ) against HT-29 cells<sup>41</sup>. On the other hand, Weaver et al., (2009) showed cytotoxicity against cancer and normal human breast and prostate cell lines for an strawberry extract enriched in anthocyanins, and the maximum concentration tested was  $10 \text{ } \mu\text{g mL}^{-1}$ , indicating that they were not selective<sup>38</sup>.

### 3.7. Antiherpes screening

The evaluation of antiherpes activity (anti-HSV-1, KOS strain) was performed using the same concentration of methanolic dried berry extracts described previously. Similarly, it was not possible to observe an inhibition of viral replication by 50% ( $\text{IC}_{50}$ ) for all tested samples. According to Cos et al., (2006), a concentration of  $0.1 \text{ mg mL}^{-1}$  should be the maximum concentration for plant extracts to obtain satisfactory antiviral activity<sup>43</sup>. Therefore, the absence of inhibition of HSV-1 replication at  $0.5 \text{ mg mL}^{-1}$  indicates that the samples tested were not active under the experimental conditions of this study. While in a previous study inhibition of HSV-1 replication was observed with extracts of strawberry fruits<sup>44</sup>, all samples tested in the present study were not active.

## 4. CONCLUSION

Anthocyanin profiles of several berries cultivated in Southern Brazil varied according to the species. Blueberries showed the highest total anthocyanin content and the highest complexity of anthocyanic compounds. For *pitanga* fruit, the presence of eight anthocyanins, which had not been previously described in this species, were detected. *Araçá* fruit showed the lowest total anthocyanin content compared to the other berries tested, and cyanidin-*O*-glucoside was identified for the first time in this fruit. The total anthocyanin content of all tested fruits showed a strong positive correlation with their free radical scavenging activity but not with their total phenolic content suggesting anthocyanins as the major

contributor to the antioxidant potential of these berries. Finally, the *in vitro* evaluation of cytotoxicity against human cancer cell lines and antiherpes activity did not present promising results at the experimental conditions tested.

### **Conflict of interest**

The authors have no conflict of interest to declare.

### **Funding**

We acknowledge the Brazilian funding agencies CAPES (MEC) and CNPq (MCTI) for research fellowships and CNPq for the financial support. .



## REFERENCES

1. Del Rio D, Rodriguez-Mateos A, Spencer JPE, Tognolini M, Borges G and Crozier A, Dietary (poly)phenolics in human health: Structures, bioavailability, and evidence of protective effects against chronic diseases. *Antioxid Redox Signal* **18**(14): 1818-1892 (2013).
2. Manganaris GA, Goulas V, Vicente AR and Terry LA, Berry antioxidants: Small fruits providing large benefits. *J Sci Food Agric* **94**(5): 825-833. (2014).
3. Tsuda T, Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. *Mol Nutr Food Res* **56**(1): 159-170 (2012).
4. Liu C, Sun J, Lu Y and Bo Y, Effects of anthocyanin on serum lipids in dyslipidemia patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **11**(9): e0162089. doi: 10.1371/journal.pone.0162089 (2016).
5. Li Y, Zhang JJ, Xu DP, Zhou T, Zhou Y, Li S and Li HB, Bioactivities and health benefits of wild fruits. *Int J Mol Sci* **17**(8): E1258 (2016).
6. Denardin CC, Hirsch GE, Da Rocha RF, Vizzotto M, Henriques AT, Moreira JCF, Guma FTCT and Emanuelli T, Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. *J Food Drug Anal* **23**(3): 387-398 (2015).
7. Hussain I, Roberto SR, Fonseca ICB, De Assis AM, Koyama R, Antunes, LEC. Phenology of Tupy and Xavante blackberries grown in a subtropical area. *Sci Hortic*, v. **201**: 78-83 (2016).
8. Moura GC, Vizzotto M, Picolotto L, Antunes LEC. Production, physico-chemical quality and bioactive compounds of misty blueberry fruit under different pruning intensities. *Revista Brasileira de Fruticultura*, v. **39**: 1-6, (2017).
9. Wang SY, Zheng W and Galletta GJ, Cultural system affects fruit quality and antioxidant capacity in strawberries. *J Agric Food Chem* **50**(22): 6534-6542 (2002).
10. Singleton VL, Orthofer R and Lamuela-Raventós RM, Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. *Methods enzymol* **299**: 152-178 (1999).

11. Lee J, Durst RW and Wrolstad RE, Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J AOAC Int* **88**(5): 1269-1278 (2005).
12. Sánchez-Moreno C, Larrauri JA and Saura-Calixto F, A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols. *J Sci Food Agric* **76**(2): 270-276 (1998).
13. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M and Rice-Evans C, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med* **26**(9-10): 1231-1237 (1999).
14. Vichai V and Kirtikara K, Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, 1(3), 1112-1116.
15. Silva IT, Costa GM, Stoco PH, Schenkel EP, Reginatto FH and Simões CMO, In vitro antiherpes effects of a C-glycosylflavonoid-enriched fraction of *Cecropia glaziovii* Sneth. *Lett Appl Microbiol* **51**(2): 143-148 (2010).
16. Giusti MM and Wrolstad RE, Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. In: Giusti, M.M. and Wrolstad, R.E., Eds., *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, John Wiley and Sons, Inc., Hoboken, F1.2.1.-F1.2.13 (2001).
17. De Pascual-Teresa S and Sanchez-Ballesta MT, Anthocyanins: From plant to health. *Phytochem Rev* **7**(2): 281-299 (2008).
18. Celli GB, Pereira-Netto AB and Beta T, Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. *Food Res Int* **44**(8): 2442-2451 (2011).
19. Einbond LS, Reynertson KA, Luo XD, Basile MJ, and Kennelly EJ, Anthocyanin antioxidants from edible fruits. *Food Chem* **84**(1): 23-28 (2004).
20. Biegelmeier R, Andrade JMM, Aboy AL, Apel MA, Dresch RR, Marin R, Raseira MDCB and Henriques AT, Comparative Analysis of the Chemical Composition and Antioxidant Activity of Red (*Psidium cattleianum*) and Yellow (*Psidium cattleianum* var. *lucidum*) Strawberry Guava Fruit. *J Food Sci* **76**(7): C991-6 (2011).
21. Seeram NP, Adams LS, Zhang Y, Lee R, Sand D, Scheuller HS and Heber D, Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red

- raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J Agric Food Chem* **54**(25): 9329-9339 (2006).
22. Andersen ØM, Fossen T, Torskangerpoll K, Fossen A and Hauge U, Anthocyanin from strawberry (*Fragaria ananassa*) with the novel aglycone, 5-carboxypyranopelargonidin. *Phytochemistry* **65**(4): 405-410 (2004).
23. Lopes-Da-Silva F, De Pascual-Teresa S, Rivas-Gonzalo J and Santos-Buelga C, Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. *Eur Food Res Technol* **214**(3): 248-253 (2002).
24. He B, Zhang LL, Yue XY, Liang J, Jiang J, Gao XL and Yue PX, Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chem* **204**: 70-76 (2016).
25. Lohachoompol V, Mulholland M, Szrednicki G and Craske J, Determination of anthocyanins in various cultivars of highbush and rabbiteye blueberries. *Food Chem* **111**(1): 249-254 (2008).
28. ICH – Guideline HT. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1),(November 2005) *International Conference on Harmonization* (2005).
29. Filippi D, Bilibio D, Bender JP, Carniel N and Priamo WL, Kinetic Extraction of Total Polyphenols from Pitanga (*Eugenia uniflora* L.): Effect of Ultrasonic Treatment, Modeling and Antioxidant Potential. *J Food Process Eng* **38**(4): 320-328 (2015).
30. Capocasa F, Scalzo J, Mezzetti B and Battino M, Combining quality and antioxidant attributes in the strawberry: The role of genotype. *Food Chem* **111**(4): 872-878 (2008).
31. Hernanz D, Recamales AF, Meléndez-Martínez AJ, González-Miret ML and Heredia FJ, Assessment of the differences in the phenolic composition of five strawberry cultivars (*Fragaria x ananassa* Duch.) grown in two different soilless systems. *J Agric Food Chem* **55**(5): 1846-1852 (2007).
32. Ornelas-Paz JDJ, Yahia EM, Ramírez-Bustamante N, Pérez-Martínez JD, Escalante-Minakata MDP, Ibarra-Junquera V, Acosta-Muñoz C, Guerrero-Prieto V and Ochoa-Reyes E, Physical attributes and chemical

- composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chem* **138**(1): 372-381 (2013).
33. Luximon-Ramma A, Baborun T and Crozier A, Antioxidant actions and phenolic and vitamin C contents of common Mauritian exotic fruits. *J Sci Food Agric* **83**(5): 496-502 (2003).
34. Medina AL, Haas LJR, Chaves FC, Salvador M, Zambiasi RC, Da Silva WP, Nora L and Rombaldi CV, Araçá (*Psidium cattleianum* Sabine) fruit extracts with antioxidant and antimicrobial activities and antiproliferative effect on human cancer cells. *Food Chem* **128**(4): 916-922 (2011).
35. Amaro LF, Soares MT, Pinho C, Almeida IF, Pinho O and Ferreira IMPLVO, Processing and storage effects on anthocyanin composition and antioxidant activity of jams produced with Camarosa strawberry. *Int J Food Sci Technol* **48**(10): 2071-2077 (2013).
36. Cerezo AB, Cuevas E, Winterhalter P, Garcia-Parrilla MC and Troncoso AM, Isolation, identification, and antioxidant activity of anthocyanin compounds in Camarosa strawberry. *Food Chem* **123**(3): 574-582 (2010).
37. Khknen MP, Heinonen M. Antioxidant Activity of Anthocyanins and Their Aglycons. *J. Agric. Food Chem.*, 51 (3): 628-633 (2003).
38. Arend GD, Adorno WT, Rezzadori K, Di Luccio M, Chaves VC, Reginatto FH and Petrus JCC, Concentration of phenolic compounds from strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch) juice by nanofiltration membrane. *J Food Eng* **201**: 36-41 (2017).
39. Huang WY, Zhang HC, Liu WX and Li CY, Survey of antioxidant capacity and phenolic composition of blueberry, blackberry, and strawberry in Nanjing. *J Zhejiang Univ Sci B* **13**(2): 94-102 (2012).
40. Elisia I, Popovich DG, Hu C and Kitts DD, Evaluation of viability assays for anthocyanins in cultured cells. *Phytochem Anal* **19**(6): 479-486 (2008).
41. Kulisic-Bilusic T, Schnäbele K, Schmöller I, Dragovic-Uzelac V, Krisko A, Dejanovic B, Milos M and Pifat G, Antioxidant activity versus cytotoxic and nuclear factor kappa B regulatory activities on HT-29 cells by natural fruit juices. *Eur Food Res Technol* **228**(3): 417-424 (2009).

42. Weaver J, Briscoe T, Hou M, Goodman C, Kata S, Ross H, McDougall G, Stewart D and Richers A, Strawberry polyphenols are equally cytotoxic to tumourigenic and normal human breast and prostate cell lines. *Int J Oncol* **34**(3): 777-786 (2009).
43. Cos P, Vlietinck AJ, Berghe DV and Maes L, Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. *J Ethnopharmacol* **106**(3): 290-302 (2006).
44. Carvalho A, Blum-Silva CH, Calvete E, Reginatto FH and Simões CMO, Anti HSV-1 activity of five strawberry cultivars. *Lat Am J Pharm* **31**(1): 133-137 (2012).



## **CAPITULO 3 - EFEITOS PREVENTIVOS DO EXTRATO DA AMORA-PRETA (*Rubus* sp.) SOBRE DISFUNÇÕES COMPORTAMENTAIS E BIOQUÍMICAS EM RATOS SUBMETIDOS A MODELO DE MANIA INDUZIDO POR CETAMINA**

### **3.1 INTRODUÇÃO**

A prevenção de diferentes patologias tem sido um dos principais apelos do consumo de alimentos funcionais. Os frutos vermelhos em especial, ricos em compostos antioxidantes, apresentam destaque principalmente pela aceitação da população em função de sua cor e sabor característicos.

O transtorno bipolar é considerado como um transtorno de humor grave, caracterizado por episódios de depressão, mania e hipomania (SUBRAMANIAM; 2013). Os episódios de mania são os mais frequentes e caracterizados por alterações de humor, inquietação, euforia, dentre outros (YOUNG, 2007). Modelos animais visando mimetizar o TB em sua totalidade não estão descritos na literatura. Desta forma, são utilizados modelos, que visam simular os principais episódios de mania. Muitos estudos têm demonstrado que o quadro maníaco induz alterações neurológicas, principalmente referentes ao estresse oxidativo e à produção de citocinas pró inflamatórias (DEBOM, et al., 2016; GAZAL et al., 2015).

Sendo assim, o presente capítulo apresenta os resultados obtidos com a administração do extrato metanólico de *Rubus* sp. cultivar Tupy, com relação à avaliação dos marcadores de estresse oxidativo e de inflamação (citocinas), em modelo animal de mania induzido por cetamina.

As seções de material e métodos, assim como a de resultados e discussão deste capítulo estão apresentadas em forma de artigo científico.

### **3.2 OBJETIVOS**

#### **3.2.1 Objetivo geral**

Avaliar os efeitos neuroprotetivos do extrato metanólico de *Rubus* sp. com relação a marcadores de estresse oxidativo e inflamação, em ratos submetidos a modelo de mania induzido por cetamina.

### 3.2.2 Objetivos específicos

- Avaliar os níveis de TBARS nas estruturas cerebrais córtex, hipocampo e estriado dos animais submetidos ao modelo de mania.
- Avaliar o conteúdo tiólico total nas estruturas cerebrais citadas.
- Avaliar o conteúdo de ROS nas estruturas cerebrais citadas.
- Avaliar o teor de nitrito/nitrato nas estruturas citadas.
- Avaliar a atividade da acetilcolinesterase nas estruturas cerebrais citadas.
- Avaliar a atividade das enzimas SOD, CAT e GPx nas estruturas cerebrais citadas.
- Avaliar a produção das interleucinas 6 e 10 nas estruturas cerebrais córtex, hipocampo e estriado dos animais submetidos ao modelo de mania.



### 3.3 PUBLICAÇÃO - ANTHOCYANINS ARE AN EFFECTIVE AGENT IN THE PREVENTION OF BEHAVIORAL AND NEUROCHEMICAL DYSFUNCTIONS OBSERVED IN RATS SUBMITTED TO A KETAMINE-INDUCED MODEL OF MANIA

**Vitor C. Chaves<sup>a#</sup>, Mayara P. Soares<sup>b#</sup>, Luiza Sphor<sup>b</sup>, Fernanda Teixeira<sup>b</sup>, Andriele Vieira<sup>d</sup>, Larissa S. Constantino<sup>e</sup>, Felipe Dal Pizzol<sup>d</sup>, Claiton L. Lencina<sup>c</sup>, Flávio H. Reginatto<sup>e</sup>, Roselia M. Spanevello<sup>b</sup>, Cláudia M.O. Simões<sup>a,e\*</sup>, Francieli Stefanello<sup>f</sup>**

<sup>a</sup> Laboratório de Virologia Aplicada, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia & Biociências Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brazil

<sup>b</sup> Laboratório de Neuroquímica, Inflamação e Câncer. Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, – Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil

<sup>c</sup> Curso de Farmácia, Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil

<sup>d</sup> Laboratório de Fisiopatologia Experimental, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Universidade do Extremo Sul Catarinense, SC, Brazil

<sup>e</sup> Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, SC, Brazil

<sup>f</sup> Laboratório de Biomarcadores, Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, – Universidade Federal de Pelotas, RS, Brazil

# These authors equally contributed to this work.

\* Author to whom correspondence should be addressed, e-mail: [chavesvc@gmail.com](mailto:chavesvc@gmail.com)

## Abstract

Bipolar disorder is a chronic mood disorder characterized by episodes of mania and depression. The aim of this study was to investigate the effects of the blackberry methanolic extract on behavioral parameters, oxidative stress and inflammatory markers, as well as on acetylcholinesterase activity in a ketamine-induced model of mania. Male rats were pretreated with this extract (200 mg/kg, once a day for 14 days), lithium chloride (45 mg/kg, twice a day for 14 days, used as a positive control), or vehicle. Between the 8th and 14th days, the animals received an injection of ketamine (25 mg/kg) or vehicle. In the 15th day, thirty minutes after ketamine administration, the locomotion of the animals was assessed by the open - field apparatus. After, the animals were euthanized, and the cerebral structures were removed for neurochemical analyses. The results have shown that ketamine treatment (25 mg/kg) by eight days induced hyperlocomotion and oxidative damage in cerebral cortex, hippocampus and striatum. In contrast, the pretreatment with the extract (200 mg/kg) or lithium (45 mg/kg) for 14 days could prevent the hyperlocomotion and the oxidative damage acting in different brain structures (cerebral cortex, hippocampus, and striatum). Besides, acetylcholinesterase activity was increased by ketamine in all analyzed structures, but extract and lithium prevented this alteration only in striatum. In addition, the levels of IL-6 increased by ketamine administration, while the extract was able to prevent this effect. The pretreatment with the extract was also effective to increase the level of IL-10 in striatum. In summary, our findings suggest that blackberry consumption could help the prevention or reduction of manic episodes since this extract have shown neuroprotective properties as well as antioxidant and anti-inflammatory effects in ketamine-induced mania model.

Keywords: *Rubus* sp.; Blackberry; Anthocyanins; Mania; Antioxidant activity; Anti-inflammatory activity.

## Introduction

Bipolar disorder (BD) is a mood disorder associated with cycling episodes of mania and depression. The estimate prevalence is about 1 to 3% in the population worldwide (Andreazza et al., 2008; Tang and Wang, 2012). Patients with BD have a higher risk of chronic diseases such as diabetes mellitus and cardiovascular disease leading to increased morbidity and mortality. The mechanisms involved in BD pathophysiology are not clearly understood, but there are evidences involving neuroinflammation, neurodegeneration, and oxidative stress (Andreazza et al., 2008; Martiniwich et al., 2009; Kapczinski et al., 2011; Selek et al., 2015). In this context, several evidences showed that detected alterations in inflammatory mediators, such as interleukin 6 (IL-6) and tumor necrosis factor alpha (TNF $\alpha$ ), suggest the activation of inflammatory pathways (Modabbernia et al., 2013; Bauer et al., 2014; Selek et al., 2015). Additionally, oxidative stress, which is characterized as an imbalance among prooxidant-antioxidant status, may be especially important in the development of BD (Jones, 2008; Ng et al., 2008; Tang and Wang, 2012) since it can lead to cell damage and death (Halliwell and Gutteridge, 2007; Kim et al., 2015).

The drugs used for the treatment of manic episodes are mood stabilizers, such as lithium, which presents several side effects, making that many BD patients do not respond positively to the treatment (Budni et al., 2013). Therefore, the search for therapeutic alternatives for BD treatment remains relevant. In this context, the research and development of new drugs including those based on natural products might be expanded significantly (Newman and Cragg, 2016). The consumption of berries, a huge group of functional foods, has demonstrated positive effects in human health such as cardiovascular disorders, inflammatory conditions and antioxidant effects. These effects have been related to specific phytochemicals, mainly phenolic compounds, such as phenolic acids, tannins, and anthocyanins (Del Rio et al., 2013; Manganaris et al., 2014).

Blackberry fruits belong to the *Rubus* genus, classified in the Rosaceae family (Daubeny, 1996). The chemical composition of these fruits is characterized by the presence of anthocyanins as major compounds that are responsible for their typical color. In the literature, many studies have associated blackberries consumption with several pharmacological activities such as antioxidant, anti-inflammatory and antimicrobial properties (Çoban et al., 2010; Ramirez et al., 2011; Denardin et al., 2015). In addition, other berries such as blueberries

(Debom et al., 2016) as well as other medicinal plant extracts rich in polyphenols (Gazal et al., 2015) also have shown neuroprotective effects. Therefore, considering the limited options for prevention and treatment of BD, this study evaluated the neuroprotective effects of the blackberry methanolic extract (*Rubus* sp.) on oxidative stress and inflammatory markers in rats submitted to a model of manic-like behavior induced by ketamine.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Animals**

Male Wistar rats (60 days old) were obtained from the Central Animal House of the Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil. Animals were maintained on a 12/12 h light/dark cycle in an air-conditioned constant temperature ( $22 \pm 1$  °C). Rats had free access to a 20 % (w/w) protein commercial chow and water. Experiments were conducted in accordance with the Committee of Ethics and Animal Experimentation of the Federal University of Pelotas, Brazil, under protocol number 4609.

### **2.2. Plant material and extraction**

*Rubus* sp. fruits, Tupy cultivar, were cultivated and harvested at *Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado* (EMBRAPA) in Pelotas, RS, Brazil ( $31^{\circ}40'50.6''S$ ;  $52^{\circ}26'23.1''W$ ). The extract was prepared according to Chaves, et al. (2017), with minor modifications. Briefly, unprocessed frozen blackberry fruits (10 g) were sonicated (Ultrasonic Cleaner 1450, Unique) for 60 min at 25°C (room temperature) in 600 mL methanol. After, the crude extract was filtered, the methanol evaporated under reduced pressure ( $\leq 35$  °C) and the residue was lyophilized yielding the extract to be tested. These procedures were performed in triplicate and protected from light.

### **2.3 Total phenolic content**

The total phenolic content was determined by the Folin-Ciocalteu assay (Singleton et al., 1999). A gallic acid standard curve was previously prepared with concentrations ranging from 60 to 300  $\mu\text{g mL}^{-1}$  ( $r^2 = 0.998$ ). Samples and standards were analyzed in triplicate. The readings were performed at 760 nm, and the results were expressed as milligrams of

gallic acid equivalent per gram of fresh fruit (mg GAE g<sup>-1</sup> FF) ± SD values.

## 2.4 Total anthocyanin content

The determination of total monomeric anthocyanin content was performed using the pH differential method (Lee et al., 2005) at two wavelengths (520 and 700 nm). The molar absorptivity coefficient ( $\epsilon$ ) for cyanidin-3-*O*-glucoside in a methanol solution used was 26600 L/M/cm. Results were expressed as mg of cyanidin-3-*O*-glucoside equivalents in 100 g of fresh fruits (mg CGE 100 g<sup>-1</sup> FF) ± SD values. All analyses were performed in triplicate.

## 2.5 Anthocyanin identification

Anthocyanins were individually identified by high performance liquid chromatography (Acquity-UPLC<sup>TM</sup>) coupled to a photodiode array detector (PDA) and a high-resolution mass spectrometer (Xevo<sup>®</sup> G2 QToF model – WATERS<sup>®</sup>) equipped with an electrospray ionization source (ESI) operating in positive mode. The chromatographic separation was achieved using a Synergi<sup>TM</sup> column (Phenomenex<sup>®</sup> - id 4  $\mu$ m, 150 x 2.0 mm) at 40 °C and the injection volume was set at 5  $\mu$ L. The elution was performed using an aqueous phase consisting of formic acid 2% (solvent A) and acetonitrile containing 1% of formic acid (solvent B). A linear gradient according the following conditions was used: 0-10 min, 5-12% B; 10-29 min, 12-18% B; 29-33 min, 18% B; 33-34 min, 5% B with a constant flow of 0.4 mL.min<sup>-1</sup>. The detection was performed at 520 nm, and the range of spectral scanning in the visible region ranged from 450 to 600 nm (PDA). Mass scanning ranged from m/z 200 to 1500 with a scan time of 0.5 s. MS/MS analyses were performed using a collision energy ramp (10 – 30 eV) with argon as the collision gas. The capillary voltage of 1.0 kV, source block temperature of 120 °C, desolvation temperature of 600 °C; nebulizer nitrogen flow rate of 80 L.h<sup>-1</sup>, desolvation nitrogen gas flow of 800 L.h<sup>-1</sup>, and cone voltage of 40 V were used controlled by MassLynx v.4.1 software for data acquisition and processing. All samples were analyzed in triplicate. The methodology was validated, and specificity, linearity, accuracy, precision, and detection and quantitation limits were measured.

## 2.6 Experimental protocol of mania state and treatment with blackberry extract

This study was designed to mimic the prevention protocol of the mania state as previously described in the literature (Ghedim et al., 2012; Gazal et al., 2014). The animals were divided into six groups: saline, saline+blackberry extract, saline+ketamine, ketamine+blackberry extract, ketamine+lithium chloride. The experimental groups were treated with blackberry extract 200 mg/kg (once a day) and lithium chloride 45 mg/kg (twice a day) for 14 days by oral administration. From the 8<sup>th</sup> to the 14<sup>th</sup> day the animals also received saline or ketamine 25 mg/kg (once a day) by intraperitoneal route administration. On the 15<sup>th</sup> day of treatment, the animals received a single injection of ketamine or saline, and the locomotor activity was assessed in the open-field apparatus after 30 min (Figure 1). The doses of ketamine, lithium chloride and blackberry extract used in the present study were chosen according to the literature (Ghedim et al., 2012; Gazal et al., 2014; Gutierrez et al., 2014; Debom et al., 2016).

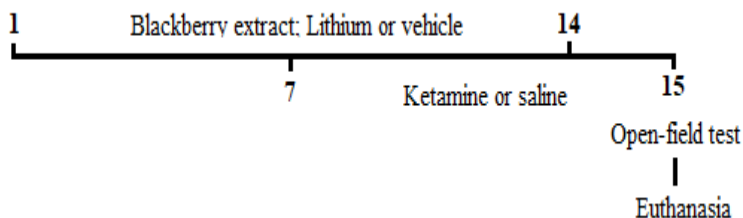


Figure 1. Treatment protocol.

## 2.7 Behavioral evaluation - Open-field test

Locomotor and anxiety-related behavior was monitored using an open-field apparatus, as previously described (Hall, 1936; Debom et al., 2016). The apparatus consisted of a wooden box measuring  $72 \times 72 \times 33$  cm. The floor of the arena was divided into 16 equal squares ( $18 \times 18$  cm) and placed in a sound free room. Animals were placed in the rear left square and left to explore it freely for 5 min. The total number of squares crossed with all paws (crossing) was manually measured to evaluate the

ambulatory behavior. The apparatus was cleaned with 40% aqueous ethanol solution and dried after each individual animal session.

## **2.8 Brain tissue preparation**

Rats were submitted to euthanasia immediately after the open-field test. Cerebral cortex, hippocampus and striatum were manually dissected, and homogenized in sodium phosphate buffer (pH 7.4) containing KCl (1:10, w/v). Homogenates were centrifuged at 2500 x g for 10 min at 4°C, the pellets were discarded, and the supernatants were immediately separated and used for the oxidative stress measurements. To assay acetylcholinesterase (AChE) activity, the tissues were homogenized for 10 min in 50 mM Tris-HCl pH 7.4 (1/10, w/v). The homogenates were centrifuged at 2000 x g, at 4°C for 10 min to yield low speed supernatants used for AChE activity measurements.

## **2.9 Protein determination**

For the analysis of oxidative stress parameters, the protein was determined as previously described (Lowry et al., 1951), or according to Bradford (1976).

## **2.10 Biochemical parameters**

### **2.10.1 Thiobarbituric acid reactive species levels**

According to Esterbauer and Cheeseman (1990), the lipid peroxidation was determined by TBARS assay. Firstly, homogenates were mixed with 10% trichloroacetic acid and 0.67% thiobarbituric acid, and then heated in a boiling water bath for 25 min. After cooling, the flocculent precipitate was removed by centrifugation. The supernatant absorbances (indicating TBARS formation) were measured at 535 nm. Results were expressed as nmol of TBARS per mg of protein.

### **2.10.2 Total sulfhydryl content**

Total sulfhydryl content (SH) was performed as described by Aksenov and Markesbery (2001). Briefly, homogenates were added to PBS buffer pH 7.4 containing EDTA. The reaction was started by the addition of 5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) and the

absorption was measured spectrophotometrically at 412 nm. The results were reported as nmol TNB per mg of protein.

### **2.10.3 Reactive oxygen species measurements**

The oxidation of dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) to fluorescent 2',7'-dichlorofluorescein (DCF) was measured for the detection of intracellular reactive oxygen species. DCF fluorescence intensity emission was recorded at 525 and 488 nm excitation 30 min after the addition of DCFH-DA to the medium. Reactive oxygen species (ROS) formation was expressed as  $\mu\text{mol}$  DCF per mg of protein and determined according to Ali et al., (1992) with minor modifications.

### **2.10.4 Superoxide dismutase activity**

This protocol was based on the inhibition of superoxide dependent adrenaline auto-oxidation to adrenochrome in a spectrophotometer at 480 nm. Total superoxide dismutase (SOD) activity was measured as described by Misra and Fridovich (1972), and the specific activity of SOD was expressed as units per mg of protein.

### **2.10.5 Catalase activity**

Catalase (CAT) activity was determined as described by Aebi (1984). Briefly, the disappearance of 30 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  in 50 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) was monitored for 180 s (37 °C) in a spectrophotometer set at 240 nm. One unit of the enzyme is defined as 1 nmol of  $\text{H}_2\text{O}_2$  consumed per minute, and the specific activity of CAT was expressed as units per mg of protein.

### **2.10.6 Glutathione peroxidase activity**

Glutathione peroxidase (GPx) activity was measured using a commercial kit (RANSEL<sup>®</sup>; Randox Lab, Antrim, UK). The specific activity was expressed as units per mg of protein.

### **2.10.7 Acetylcholinesterase activity**

Acetylcholinesterase (AChE) activity was determined as previously described by the colorimetric method of Ellman et al.



(1961). The reaction system was composed 10 mM DTNB, 100 mM phosphate buffer (pH 7.5) and 15  $\mu$ L of homogenate was incubated, after this 8 mM acetylthiocholine were added. The absorbance was read in a spectrophotometer at 412 nm for 2 min with interval of 30 sec at 27°C. AChE activity was expressed as  $\mu$ mol AcSCh/h/mg of protein.

#### 2.10.8 Nitrite levels

Nitric oxide (NO) production was measured by the accumulation of nitrite considered an indicator of NO by Stuehr et al. (1989). For this assay, the supernatants were used in a colorimetric reaction with Griess reagent [0.1% N-(1-naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride]. After, 50  $\mu$ l of sulfanilamide in 5% phosphoric acid were added to 50  $\mu$ l of supernatants and the samples were maintained at room temperature for 10 min. Subsequently, samples were mixed with 100  $\mu$ L of Griess reagent and incubated for 10 min in the dark. Absorbances were measured at 540 nm, and the nitrite levels were expressed as  $\mu$ mol of nitrite per mg of protein.

#### 2.10.9 Cytokine analysis

Levels of IL-6 and IL-10 were measured in the cerebral structure using immunoassay kits (DuoSet ELISA Development, R&D Systems, Inc., USA) according to the manufacturer's instructions. The presence and concentration of these cytokines were determined by the intensity of the color measured by spectrometry in a micro ELISA reader.

#### 2.11 Statistical analysis

Comparisons between experimental groups were performed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey *post hoc* test. The values were expressed as mean  $\pm$  S.E.M.  $p < 0.05$  was considered significant.

### 3. Results

#### Chemical characterization

The total phenolic content of methanolic extract of *Rubus* sp. fruit was measured by Folin ciocalteu method and the content was 111.53

$\pm 0.62$  mg GAE/g of dried extract. Total anthocyanin content was analyzed by pH differential method and showed  $10.56 \pm 0.29$  mg CGE/g of dried extract.

Furthermore, the LC/DAD/MS of blackberry extract was also performed. The chromatographic analyzes were carried out on a reverse phase column, which provided an efficient separation for the identification of detected anthocyanin compounds. The methodology was validated according to ICH guidelines (2005) using cyanidin-3-*O*-glucoside as analytical standard, and the parameters evaluated were accuracy, precision, specificity, linearity, and limits of detection and quantification (data not show).

Since the anthocyanins exhibit a characteristic absorption band at wavelengths ranging from 500 to 550 nm in the visible region of the electromagnetic spectra, the identification of anthocyanins was previously performed by the PDA detector (Giusti and Wrolstad, 2001).

The individual identification of anthocyanins was based on their MS/MS spectra and their exact mass values. The anthocyanins identified were cyanidin-*O*-glucoside, as the major anthocyanin component, cyanidin-*O*-galactoside, cyanidin-*O*-rutinoside, pelargonidin-*O*-glucoside and cyanidin-*O*-malonylhexoside (Table 1).

Table 1 - Anthocyanins identified in the blackberry methanolic extract.

Anthocyanin	Retention time (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Molecular formula	[M] <sup>+</sup> m/z (Error - ppm)	Main fragments m/z
Cyanidin- <i>O</i> -galactoside	7.70	515	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	449.1065 (-4.2)	287
Cyanidin- <i>O</i> -glucoside	8.49	515	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>11</sub> <sup>+</sup>	449.1065 (-4.2)	287
Cyanidin- <i>O</i> -rutinoside	9.14	517	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub> <sup>+</sup>	595.1705 (7.1)	449
Pelargonidin- <i>O</i> -glucoside	10.29	500	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>10</sub> <sup>+</sup>	433.1130 (1.2)	271
Cyanidin- <i>O</i> -malonylhexoside	12.87	518	C <sub>24</sub> H <sub>23</sub> O <sub>14</sub> <sup>+</sup>	535.1062 (-4.9)	449; 287

## Behavioral evaluation

The results obtained with the animal model of mania showed that ketamine was able to increase rats' locomotion, which was observed by an increase in the crossing number in the open-field test (Figure 2). In

contrast, the pretreatment with lithium or the blackberry extract prevented the hyperlocomotion induced by ketamine ( $F(4-37) = 8.72, p < 0.05$ ).

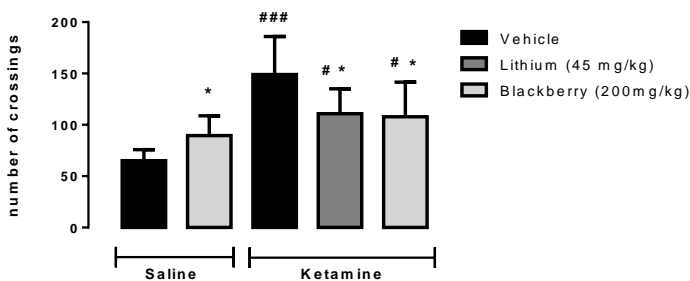


Figure 2. Effects of *Rubus sp.* methanolic extract (200 mg/kg, *p.o.*) and lithium chloride (45 mg/kg, *p.o.*) pretreatment on ketamine-induced hyperlocomotion measured in the open-field apparatus using rats.

Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. #  $p < 0.05$  and ##  $p < 0.01$  when compared to vehicle/saline group. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$  when compared to vehicle/ketamine group (n = 8-10).

### Neurochemical parameters in cerebral cortex

The results of the oxidative stress markers evaluation in the cerebral cortex of the rats are shown in Figure 3. The ketamine administration was able to decrease SH concentration, and the pretreatment with lithium and blackberry extract were able to prevent this effect ( $F(4-18) = 9.27, p < 0.05$ ). The ROS levels were significantly increased by ketamine treatment, while the pretreatment with lithium or blackberry extract were able to prevent this alteration ( $F(4-15) = 4.57, p < 0.05$ ). Similar results were found for TBARS levels since it increased in the ketamine group, meanwhile the pretreatment with lithium reduced these levels ( $F(4-18) = 10.06, p < 0.05$ ). No changes were observed in the nitrite contents ( $p > 0.05$ ).

Regarding the antioxidant enzymes activity, the results are shown in Figure 3. As observed, SOD and CAT activities were reduced by ketamine treatment. The pretreatment with lithium prevented SOD ( $F(4-18) = 4.01, p < 0.05$ ) and CAT alterations, and the pretreatment with the blackberry extract caused only a CAT activity reduction ( $F(4-18) = 5.51, p < 0.05$ ). On the other hand, AChE activity was increased by ketamine administration ( $F(4-18) = 4.18, p < 0.05$ ) and both pretreatments

were not efficient to reduce this activity. No changes were observed in the GPx activity ( $p>0.05$ ).

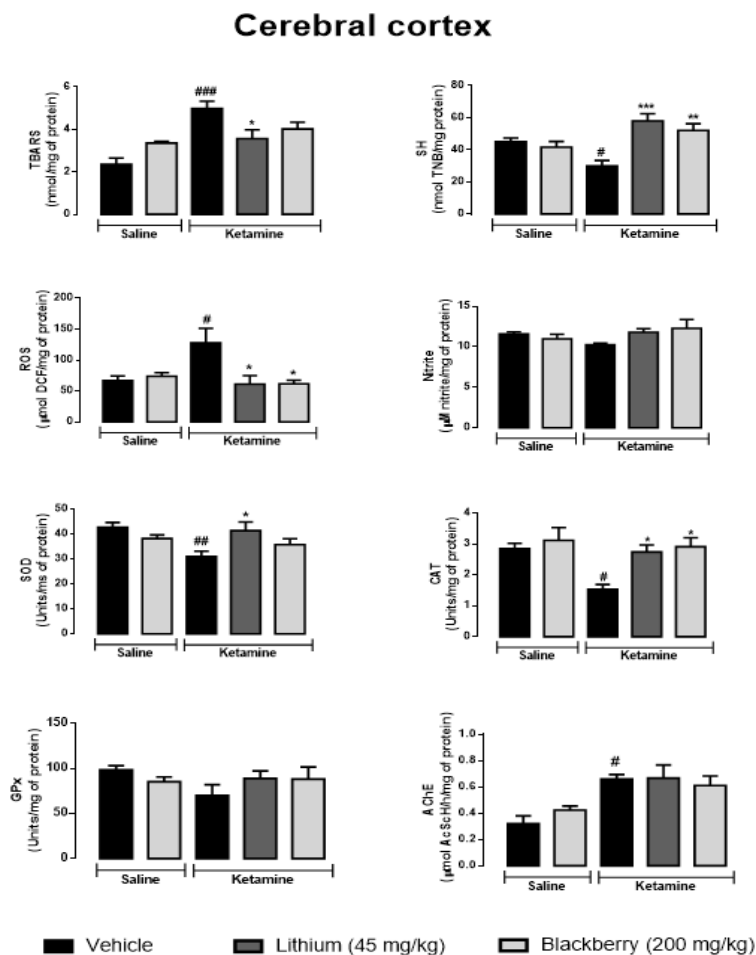


Figure 3. Effects of *Rubus sp.* methanolic extract (200 mg/kg, *p.o.*) and lithium chloride (45 mg/kg, *p.o.*) pretreatment on ROS formation; TBARS, total thiol content (SH) and nitrite (Nox) levels; superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and acetylcholinesterase (AChE) activities, in the cerebral cortex of rats submitted to ketamine-induced manic-like behavior. Data are reported as mean ± S.E.M. #  $p < 0.05$  and ###  $p < 0.01$  when compared to vehicle/saline group. \*  $p < 0.05$  when compared to vehicle/ketamine group (n = 4–5).

### **Neurochemical parameters in hippocampus**

The results of the oxidative stress markers evaluation in the hippocampus the rats are shown in Figure 4. The ROS ( $F(4-20) = 10.58$ ,  $p < 0.05$ ) and TBARS ( $F(4-17) = 14.58$ ,  $p < 0.05$ ) levels were significantly increased by ketamine administration, while the pretreatment with lithium or the blackberry extract were able to prevent these effects. No changes were found in SH and nitrite levels in all experimental groups.

Regarding to the antioxidant enzymes activity, ketamine treatment decreased SOD ( $F(4-16) = 4.14$ ,  $p < 0.05$ ) and CAT ( $F(4-18) = 4.01$ ,  $p < 0.05$ ) activities. On the other hand, lithium or the blackberry extract treatments were able to prevent these changes. Furthermore, it was detected that the AChE activity was increased by ketamine administration ( $F(4-17) = 4.26$ ,  $p < 0.05$ ) while the pretreatments were not efficient in reducing this activity. No changes were observed in the GPx activity ( $p > 0.05$ ).

## Hippocampus

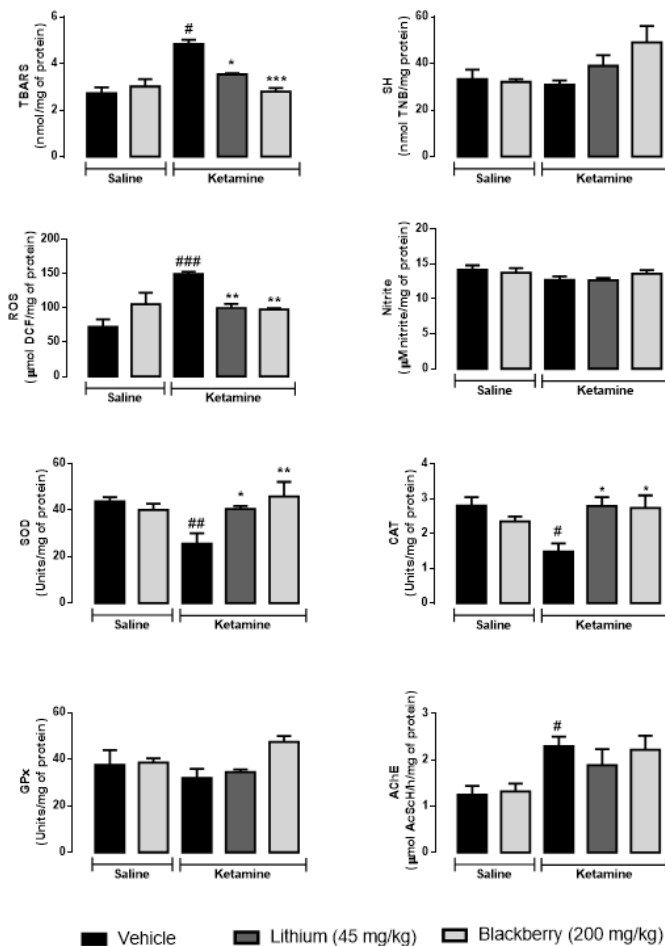


Figure 4. Effects of *Rubus sp.* methanolic extract (200 mg/kg, *p.o.*) and lithium chloride (45 mg/kg, *p.o.*) pretreatment on ROS formation; TBARS, total thiol content (SH) and nitrite (Nox) levels; superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and acetylcholinesterase (AChE) activities, in the hippocampus of rats submitted to ketamine-induced manic-like behavior. Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. #  $p < 0.05$  and ###  $p < 0.01$  when compared to vehicle/saline group. \*  $p < 0.05$  when compared to vehicle/ketamine group (n = 4–5).

### **Neurochemical parameters in striatum**

The results of the oxidative stress markers evaluation in the striatum of the rats are shown in Figure 5. The ketamine treatment was able to increase ROS ( $F(4-18) = 5.16, p < 0.05$ ) and nitrite ( $F(4-17) = 5.61, p < 0.05$ ) levels, while the lithium or the blackberry extract pretreatments were efficient to prevent these alterations. Similarly, TBARS levels were increased by ketamine treatment, while the lithium pretreatment was able to prevent this effect ( $F(4-16) = 12.88, p < 0.05$ ). No changes were found in SH levels ( $p > 0.05$ ) in all experimental groups.

No changes were observed on SOD and CAT ( $p > 0.05$ ) activities, while GPx activity was significantly reduced by the ketamine treatment ( $F(4-15) = 3.77, p < 0.05$ ). Furthermore, lithium or the blackberry extract pretreatment were not able to prevent the reduction of the activity of these antioxidant enzymes ( $p > 0.05$ ). Finally, the AChE activity was increased by the ketamine administration and the pretreatment with lithium and blackberry extract were efficient in preventing the increase of AChE activity ( $F(4-15) = 14.10, p < 0.05$ ).

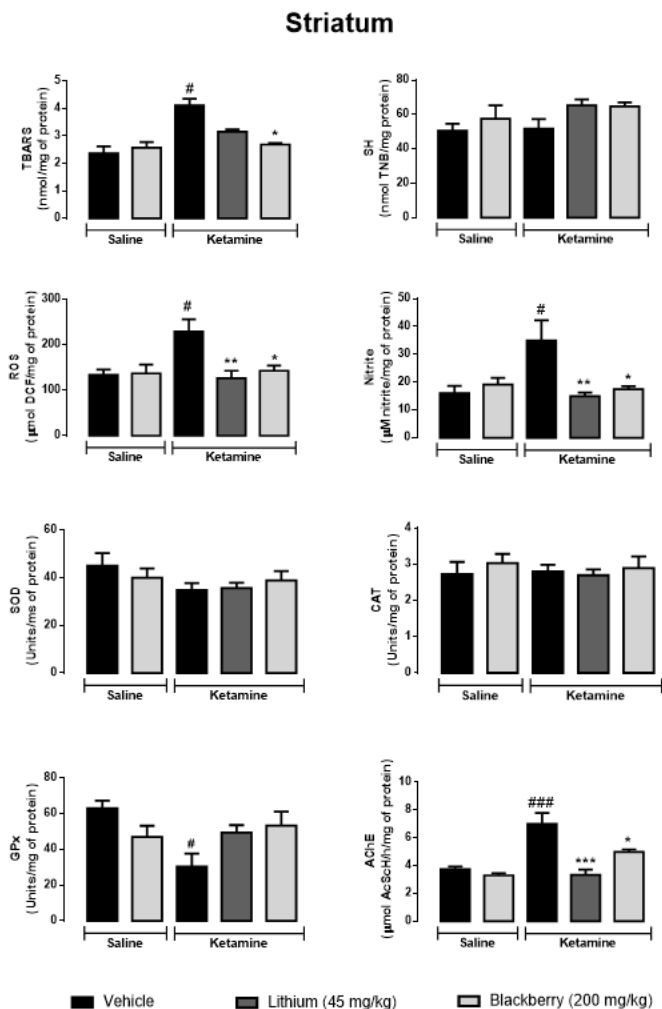


Figure 5. Effects of *Rubus sp.* methanolic extract (200 mg/kg, *p.o.*) and lithium chloride (45 mg/kg, *p.o.*) pretreatment on ROS formation; TBARS, total thiol content (SH) and nitrite (Nox) levels; superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and acetylcholinesterase (AChE) activities, in the striatum of rats submitted to ketamine-induced manic-like behavior. Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. #  $p < 0.05$  and ###  $p < 0.01$  when compared to vehicle/saline group. \*  $p < 0.05$  when compared to vehicle/ketamine group ( $n = 4-5$ ).



## Cytokine analysis

The results of the inflammatory parameters evaluation shown an increase of IL-6 in the cerebral cortex ( $F(4-17) = 2.25$ ,  $p < 0.05$ ) and striatum ( $F(4-18) = 6.56$ ,  $p < 0.05$ ) in the group treated with ketamine, while the pretreatments with lithium or the blackberry extract were effective to prevent the increase of this cytokine. In the hippocampus no changes were observed in all experimental groups ( $p > 0.05$ ) (Figure 6).

In relation to the IL-10 levels, different profiles in the cerebral structures were observed. In the cerebral cortex, levels increased in ketamine group ( $F(4-14) = 18.93$ ,  $p < 0.05$ ), while the pretreatment with lithium or the blackberry extract did not change IL-10 levels ( $p > 0.05$ ) when compared to the control group. In the striatum, ketamine also increased IL-10 levels, and the blackberry extract pretreatment shown an increase when compared to the ketamine group ( $F(4-13) = 23.05$ ,  $p < 0.05$ ). Finally, the ketamine treatment did not show differences in IL-10 levels in the hippocampus ( $p > 0.05$ ); although, the pretreatment with the blackberry extract reduced the levels of this cytokine ( $F(4-15) = 67.04$ ,  $p < 0.05$ ) (Figure 6).

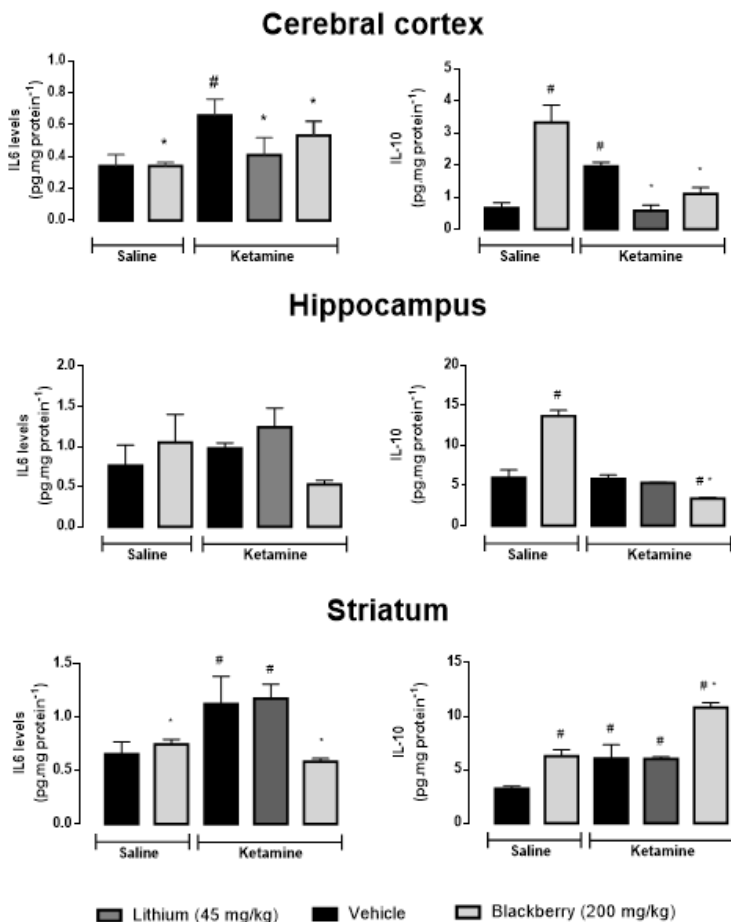


Figure 6. Effects of *Rubus* sp. methanolic extract (200 mg/kg, p.o.) and lithium chloride (45 mg/kg, p.o.) pretreatment in serum levels of IL-6 and IL-10 of animals submitted to ketamine-induced manic-like behavior. Data are reported as mean  $\pm$  S.E.M. #  $p < 0.05$  and ##  $p < 0.01$  when compared to vehicle/saline group. \*  $p < 0.05$  and \*\*  $p < 0.01$  when compared to vehicle/ketamine group (n = 4–5).

#### 4. Discussion

The chemical profile and the preventive effects of the blackberry methanolic extract on behavioral and neurochemical dysfunctions in rats submitted to a ketamine-induced model of mania were evaluated.

Concerning the chemical composition, the total phenolic content of the extract was calculated as 111.53 mg GAE/g of extract, while the total anthocyanin content was 10.56 mg CGE/g of extract. The group of phenolic compounds is the main set of secondary metabolites present in blackberry fruits. Anthocyanins belong to the most abundant subgroup of phenolics and are responsible for the antioxidant potential of these fruits (Manganaris et al., 2014; Smeriglio et al., 2016). The high-resolution mass spectrometry of the bioactive compounds presents in the blackberry methanolic extract allowed the identification of five anthocyanins, which four are derivative from cyanidin aglycone and one from pelargonidin. All these compounds have been previously described for these fruits (Seeram et al, 2006; Wu et al., 2006; Veberic et al., 2015).

In this work, the effects of a blackberry methanolic extract were determined in an experimental model of manic-like behavior induced by ketamine in rats, and it seems to be efficient to mimic the episodes of mania (Kato et al., 2007). Ketamine is an anesthetic drug that present different effects in sub doses on mood and behavior. At lower doses, these effects can be antidepressive and at higher doses, they induce hyperlocomotion and a manic-like behavior (Ghedim et al, 2012). Moreover, ketamine acts as an antagonist of *N*-methyl-aspartate (NMDA) glutamate receptors, which are commonly found in brain areas involved in behavioral functions. In this way, this model really represents the manic-like behavior since it produces behavioral and biochemical alterations such as hyperlocomotion, oxidative stress, and changes in levels of brain-derived neurotrophic factor similar to those found in bipolar disorder (Ghedim et al, 2012, Fraga et al., 2013).

The primary production of superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) in mitochondrial membranes and the secondary free radical reactions in the mitochondrial membranes and matrix have been indicate as causes for several CNS disorders (Tritschler et al., 1994). Moreover, Kunz et al. (2008) have shown an increase in serum thiobarbituric acid reactive substances (TBARS, a marker of lipid peroxidation) in manic bipolar patients. Finally, altered antioxidant systems and signs of increased oxidative stress are observed in peripheral tissues and brains of manic bipolar patients, including abnormal prefrontal levels of glutathione

(GSH), the major cellular redox regulator and antioxidant. (Kulak et al., 2013).

Our results showed that ketamine treatment induced hyperlocomotion and brain oxidative damage since we detected alterations in some oxidative stress markers such as increase of the TBARS and ROS levels in the cerebral cortex, hippocampus and striatum of rats. Moreover, ketamine administration decreased the total thiol content in cerebral cortex, as well as the antioxidant enzyme activities (SOD and CAT) in cerebral structures. The reduction of these enzymes is also an indicative of oxidative damage, which can carry to an increase of  $O_2^{\cdot-}$  and hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ) levels, which may generate hydroxyl radicals unleashing the lipid peroxidation. In this context, SOD is responsible by reducing the  $O_2^{\cdot-}$  in  $H_2O_2$ , and CAT and GPx were involved in this product degradation (Halliwell and Gutteridge, 2007; Pisoschi and Pop, 2015).

In contrast to the ketamine group, the pretreatment with lithium or the blackberry extract prevented the hyperlocomotion as well as shown to be effective in reducing oxidative damage and ROS generation. These promising properties could be explained by the accumulation of anthocyanins in the tested extract. Anthocyanins possess an antioxidant power higher than other conventional antioxidants such as  $\alpha$ -tocopherol, trolox and catechin. These effects derive from the chemical structure of the anthocyanin molecule and, particularly, from the number of hydroxyl groups, the catechol moiety in the B ring, and the oxonium ion in the C ring (Manganaris et al., 2014; Smeriglio et al., 2016). These findings are in agreement with other studies that used the same experimental model testing different samples to prevent manic episodes, such as a blueberry extract, curcumin, and a medicinal plant extract rich in phenolic compounds (Gazal et al., 2014; Gazal et al., 2015; Debom et al., 2016).

Since several studies have demonstrated the involvement of different neurotransmitters pathway in mood disorders (Henter et al., 2017), the role of cholinergic route in the mania model mediated by AChE activity was also evaluated. Our results showed an increase in AChE activity in all brain areas of the animals submitted to mania model. On the other hand, the treatment with lithium and the blackberry extract were effective in reducing this enzyme activity in the striatum. It is important to highlight that another study using the cell line HEK293T also showed that lithium treatment demonstrated a rapid proteasomal degradation of overexpressed AChE-S (Jing et al., 2013). In opposition to, in a model of schizophrenia mediated by ketamine, using the same protocol, the AChE activity did not show differences in the cortex, hippocampus and striatum

(Zugno et al., 2014). Our results suggest that the inhibition of AChE activity detected herein could represent advantages in the mood disorder therapies (Khouzam and Kissmeyer, 1996).

Inflammation is another important component in psychiatric disturbances since an increase on plasma levels of cytokines and inflammatory mediators were described in models of depression and mood disorders (Gold et al., 2015). Moreover, since the relation between inflammation and oxidative stress is narrow, the relationship between ROS production and stimulation of synthesis and release of IL-6 has also been described (Kosmidou et al., 2002; Berk et al., 2011). In the same way, an increase on proinflammatory cytokines levels, such as IL-6, was found in different phases of BD and in manic episodes (Kunz et al., 2011; Bauer et al., 2014; Munner et al., 2016).

In this work, an increase of IL-6 levels was detected in cerebral cortex and striatum after administration of ketamine. In contrast, the pretreatment with lithium or blackberry extract prevented these alterations. These results are in agreement with previous studies that found highest levels of IL-6 in manic episodes (Boufidou et al., 2004; Kunz et al., 2011; Ozdemircan et al., 2015; Debom et al., 2016). Furthermore, ROS may be responsible for stimulating the synthesis of IL-6 since this association can occur in physiological and pathological conditions (Kosmidou et al., 2002). As previously described, the increase of IL-10 (anti-inflammatory cytokine) in cerebral cortex and striatum were observed in animals that received ketamine (Yang et al., 2013; Sun et al., 2016). The pretreatment with the blackberry extract was effective in increasing IL-10 levels in the striatum, which may promote anti-inflammatory effects in striatum.

## **Conclusion**

Our findings suggest that blackberry consumption could help the prevention or reduction of manic episodes since this extract showed neuroprotective properties as well as antioxidant and anti-inflammatory effects in ketamine-induced mania model.

## References

- Aebi, H, 1984. Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*, v. 105, p. 121–126.
- Aksenov, M. Y., Markesbery, W. R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, v. 302, p. 141–145.
- Ali, S. F., Lebel, C. P., Bondy, S. C., 1992. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*, v. 13, p. 637–648.
- Andreazza, A.C., Kauer-sant'anna, M., Frey, B.N., Bond, D.J., Kapczinski, F., Young, L.T., Yatham, L.N., 2008. Oxidative stress markers in bipolar disorder: a meta-analysis. *J. Affect. Disord.* 111 (1), 135–144, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2008.04.013>.
- Bauer, J., Pascoe, M., Wollenhaupt-Aguiar, B., Kapczinski, F., Soares, J., 2014. Inflammatory mediators of cognitive impairment in bipolar disorders. *J. Psychiatr. Res.* 56 (1), 18–27, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2014.04.017>.
- Berk, M., Kapczinski, F., Andreazza, A.C., Dean, O.M., Giorlando, F., Maes, M., Yucel, M., Gama, C.S., Dodd, S., Dean, B., Magalhães, P.V.S., Amminger, P., McGorry, P., Malhi, G.S., 2011. Pathways underlying neuroprogression in bipolar disorder: focus on inflammation, oxidative stress and neurotrophic factors. *Neurosci.*
- Boufidou, F., Nikolaou, C., Alezivos, B., Liappas, I., Christodoulou, G., 2004. Cytokine production in bipolar affective disorder patients under lithium treatment. *J. Affect. Disord.* 82 (1), 309–313, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2004.01.007>.
- Bradford, M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248–54.
- Budni, J., Valvassori, S.S., Quevedo, J., 2013. Biological mechanisms underlying neuroprogression in bipolar disorder. *Revista Brasileira de*

Psiquiatria, Rio de Janeiro 35 (1), 1–2,  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.rbp.2013.01.001>.

Chaves, V. C., Calvete, E. Reginatto, F. H. 2017. Quality properties and antioxidant activity of seven strawberry (*Fragaria x ananassa* duch) cultivars. 225, 293 – 298.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.013>.

Çoban, E. P., Biyik, H., 2010. Antimicrobial activity of the ethanol extracts of some plants natural growing in Aydin, Turkey. *African Journal of Microbiology Research*, v.4, n.21, p.2318-2323.

Daubeny, 1996. H. Brambles. *Fruit breeding*, v.2, p.109-190.

Debom, G., Gazal, M., Soares, M. S. P., Couto, C. A. T., Mattos, B., Lencina, C., Kaster, M. P., Ghisleni, G. C., Tavares, R., Braganhol, E., Chaves, V. C., Reginatto, F. H., Stefanello, F., Spanevello, R. M. 2016. Preventive effects of blueberry on behavioral and biochemical dysfunctions in rats submitted to a model of manic behavior induced by ketamine. *Brain Res. Bull.* 127, 260 – 269,  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.brainresbull.2016.10.008>.

Del Rio, D., Rodriguez-Mateos, A., Spencer, P. E. J., Tognolini, M., Borges, G., Crozier, A., 2013. Dietary (Poly)phenolics in Human Health: Structures, Bioavailability, and Evidence of Protective Effects Against Chronic Diseases. *Antioxidants & Redox Signaling*. 18, 1818 – 1892.

Denardin, C. C., Hirsch, G. E., Da rocha, R. F., 2015. Antioxidant capacity and bioactive compounds of four Brazilian native fruits. *Journal of Food and Drug Analysis*, v.23, n.3, p.387-398.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V., Featherstone, R. M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical Pharmacology*, v. 7, p. 88-95.

Esterbauer, H., Cheeseman, K. H., 1990. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 407–421.

Fraga, D.B., Réus, G.Z., Abelaira, H.M., Luca, D.E., Canever, R.D., Pfaffenseller, L., Colpo, B., Kapczinski, G.D., Quevedo, F., Zugno, J.,

2013. Ketamine alters behavior and decreases BDNF levels in the rat brain as a function of time after drug administration. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 35 (3), 262–266, <http://dx.doi.org/10.1590/1516-4446-2012-0858>.

Gazal, M., Valente, M. R., Acosta, B. A., Kaufmann, F. N., Braganhol, E., Lencina, C. L., Stefanello, F. M., Ghisleni, G., Kaster, M. P., 2014. Neuroprotective and antioxidant effects of curcumin in a ketamine-induced model of mania in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 5, p. 132-139.

Gazal, M., Kaufmann, F. N., Acosta, B. A., Oliveira, P. S., Valente, M. R., Ortamann, C. F., Sturbelle, R., Lencina, L. C., Stefanello, F. M., Kaster, M. P., Reginatto, F. H., Ghisleni, G. 2015. Preventive Effect of *Cecropia pachystachya* Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats. *Neurochem Res.* 40 (7), 1421 – 1430.

Ghedim, F. V., Fraga, D. de B., Deroza, P. F., Oliveira, M. B., Valvassori, S. S., Steckert, A. V., Budni, J., Dal-pizzol, F., Quevedo, J.; Zugno, A. L., 2012. Evaluation of behavioral and neurochemical changes induced by ketamine in rats: implications as an animal model of mania. *Journal of Psychiatric Research*, v. 46, p. 1569-1575.

Giusti, M.M., Wrolstad, R.E., 2001. Characterization and measurement of anthocyanins by UV-visible spectroscopy. *Curr. Protoc. Food Anal. Chem.*

Gold, P.W., Machado-Vieira, R., Pavlatou, M.G., 2015. Clinical and biochemical manifestations of depression: relation to the neurobiology of stress. *Neural Plast.*

Gutierrez, J.M., Carvalho, F.B., Schetinger, M.R.C., Marisco, P., Agostinho, P., Rodrigues, M., Rubin, M.A., Schmatz, R., Silva, C.R., Cognato, G.P., Farias, J.G., Signor, C., Morsch, V.M., Mazzanti, C.M., Bogo, M., Bonan, C.D., Spanevello, R., 2014. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life Sci.* 96 (1), 7–17, <http://dx.doi.org/10.1016/j.lfs.2013.11.014>.



Hall, C. S., 1936. Emotional behavior in rats. Part II. The relationship between need and emotionality. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, v. 22, p. 61-68.

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press, New York.

Henter, I.D., de Sousa, R.T., Gold, P.W., Brunoni, A.R., Zarate, C.A., Machado-Vieira, R., 2017. Mood Therapeutics: Novel Pharmacological Approaches for Treating Depression. *Expert Rev Clin Pharmacol.*;10(2):153-166. <http://dx.doi.org/10.1080/17512433.2017.1253472>.

ICH - Guideline, H.T., 2005. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), (November 2005) International Conference on Harmonization.

Jing, P., Zhang, J.Y., Ouyang, Q., Wu, J., Zhang, X.J., 2013. Lithium treatment induces proteasomal degradation of over-expressed acetylcholinesterase (AChE-S) and inhibit GSK3 $\beta$ . *Chem Biol Interact.*;203(1):309-13. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2012.08.010>.

Jones, D., 2008. Radical free biology of oxidative stress. *Am. J. Physiol.* 295 (1), 849–868, <http://dx.doi.org/10.1152/ajpcell.00283.2008>.

Kapczinski, F., Dal-Pizzol, F., Teixeira, A.L., Magalhaes, P.V., Kauer-Sant'anna, M., Klamt, F., Moreira, J.C., Pasquali, M.A., Fries, G.R., Quevedo, J., Gama, C.S., Post, R., 2011. Peripheral biomarkers and illness activity in bipolar disorder. *J. Psychiatr. Res.* 45 (2), 156–216, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpsychires.2010.05.015>.

Kato, T., Kubota, M., Kasahara, T., 2007. Animal models of bipolar disorder. *Neurosci Biobehav Rev* 31:832–842.

Khouzam, H.R., Kissmeyer, P.M., 1996. Physostigmine temporarily and dramatically reversing acute mania. *Gen Hosp Psychiatry*; 18:203–204.

Kim, G., Kim, J., Rhie, S., Yoom, S., 2015. The role of oxidative stress in neurodegenerative disease. *Exp. Neurobiol.* 24 (1), 325–340, <http://dx.doi.org/10.5607/en.2015.24.4.325>.

Kosmidou, I., Vassilakopoulos, T., Xagorari, A., Zakynthinos, S., Papapetropoulos Roussos, C., 2002. Production of interleukin-6 by skeletal myotubes: role of reactive oxygen species. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 26 (5), 587–593, <http://dx.doi.org/10.1165/ajrcmb.26.5.4598>.

Kulak, A., Steullet, P., Cabungcal, J., Werge, T., Ingason, A., Cuenod, M. Do, Q., 2013. Redox Dysregulation in the Pathophysiology of Schizophrenia and Bipolar Disorder: Insights from Animal Models. *Antioxidants & Redox Signaling* 18 (12), 1428 – 1443.

Kunz, M., Ceresér, K.M., Goi, P.D., Fries, G.R., Teixeira, A.L., Fernandes, B.S., Belmonte – de – Abreu, P.S., Kauer-Sant’Anna, M., Kapczinski, F., Gama, C.S., 2011. Serum levels of IL-6, IL-10 and TNF- $\alpha$  in patients with bipolar disorder and schizophrenia: differences in pro- and anti-inflammatory balance. *Rev. Bras. Psiquiatr.* 33, 268–274.

Kunz, M., Gama, C.S., Andreazza, A.C., Salvador, M., Ceresér, K. M., Gomes, F. A., Belmonte-de-Abreu, P. S. Berk, M., Kapczinski, F., 2008. Elevated serum superoxide dismutase and thiobarbituric acid reactive substances in different phases of bipolar disorder and in schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry.* 1; 32(7), 1677 -1681.

Lee, J., Durst, R.W., Wrolstad, R.E., 2005. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: collaborative study. *J. AOAC Int.* 88 (5), 1269–1278.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., Randall, R. J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265–275.

Manganaris, G. A., Goulas, V., Vicente, A. R., Terry, L. A., 2014. Berry antioxidants: small fruits providing large benefits. *J Sci Food Agric.* 94, 825 – 833.

Martinowich, K., Schloesser, R.J., Manji, H.K., 2009. Bipolar disorder: from genes to behavior pathways. *J. Clin. Invest.* 119 (4), 726zx–736, <http://dx.doi.org/10.1172/jci37703>.

- Misra, H. P., Fridovich, I., 1972. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 247, p. 3170–3175.
- Modabbernia, A., Taslimi, S., Brietzke, E., Ashrafi, M., 2013. Cytokines alterations in bipolar disorder: a meta analysis of 30 studies. *Biol. Psychiatry* 74 (1), 15–25, <http://dx.doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.01.007>.
- Munner, A., 2016. Bipolar disorder: roll of inflammation a development of diseases biomarkers. *Psychiatry Investig.* 13 (1), 18–30, <http://dx.doi.org/10.4306/pi>.
- Newman, D. J., Cragg, G. M., 2016. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, v.79, n.3, p.629-661,
- Ng, F., Berk, M., Dean, O., Bush, A.I., 2008. Oxidative stress in psychiatric disorders: evidence base and therapeutic implications. *Int J Neuropsychopharmacol* 11:851–876.
- Ozdemircan, A., Dasdemir, S., Kucukali, C.I., Bireller, E.S., Ozturk, H., Cakmakoglu, B., 2015. COX-2 gene variants in bipolar disorder-I. *Psychiatr. Danub.* 27 (4), 385–389.
- Pisoschi, A., Pop, A., 2015. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: a review. *Eur. J. Med. Chem.* 97 (1), 55–74, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2015.04.040>.
- Ramirez, M. R., Apel, M. A., Raseira, M. C. B., 2011. Polyphenol content and evaluation of antichemotactic, antiedematogenic and antioxidant activities of rubus sp. cultivars. *Journal of Food Biochemistry*, v.35, n.5, p.1389-1397.
- Seeram, N. P., Adams, L. S., Zhang, Y., 2006. Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, n.25, p.9329-9339.

Selek, S., Altindag, A., Saracogleu, G., Aksoyy, N., 2015. Oxidative markers of myeloperoxidase and catalase and their diagnostic performance in bipolar disorder. *J. Affect. Disord.* 1 (1), 181–192, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jad.2015.03.058>.

Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Oxid. Antioxid. Part A* 299, 152–178.

Smeriglio, A., Barreca, D., Bellocco, E., 2016. Chemistry, Pharmacology and Health Benefits of Anthocyanins. *Phytotherapy Research*, 1265-1286.

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

Sun, Y.T., Hou, M., Zou, T., Liu, Y., Li, J., Wang, Y.L., 2016. Effect of ketamine anesthesia on cognitive function and immune function in young rats. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*.62(4):63-6.

Tang, V., Wang, J.F., 2012. Oxidative stress in bipolar disorder. *Biochem Anal Biochem*, <http://dx.doi.org/10.4172/2161-1009.S2-002>.

Tritschler H.J., Packer, L., Medori, R., 1994. Oxidative stress and mitochondrial dysfunction in neurodegeneration. *Biochem Mol Biol Int.* 34 (1), 169-181.

Veberic, R., Slatnar, A., Bizjak, J., 2015. Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *LWT - Food Science and Technology*, v.60, n.1, p.509-517.

Wu, X., Beecher, G. R., Holden, J. M., 2006. Concentrations of anthocyanins in common foods in the United States and estimation of normal consumption. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.54, n.11, p.4069-4075.

Yang, C., Shen, J., Hong, T., Hu, T.T., Li, Z.J., Zhang, H.T., Zhang, Y.J., Zhou, Z.Q., Yang, J.J., 2013. Effects of ketamine on lipopolysaccharide-induced depressive-like behavior and the expression

of inflammatory cytokines in the rat prefrontal cortex. *Mol Med Rep.* 8(3):887-90. doi: 10.3892/mmr.2013.1600.

Zugno, A.I., Matos, M.P., Canever, L., Fraga, D.B., De Luca, R.D., Ghedim, F.V., Deroza, P.F., de Oliveira, M.B., Pacheco, F.D., Valvassori, S.S., Volpato, A.M., Budni, J., Quevedo, J., 2014. Evaluation of acetylcholinesterase activity and behavioural alterations induced by ketamine in an animal model of schizophrenia. *Acta Neuropsychiatr.* 26(1):43-50. <http://dx.doi.org/10.1017/neu.2013.31>.



## **CAPITULO 4 – AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DO EXTRATO DA AMORA-PRETA (*Rubus* sp.) EM PREVENIR O PROCESSO DE NEUROINFLAMAÇÃO INDUZIDO POR LIPOPOLISSACARÍDEO, EM MODELO ANIMAL**

### **4.1 INTRODUÇÃO**

A capacidade de flavonoides de atravessar a barreira hematoencefálica e atingir tecidos cerebrais foi descrita recentemente (SCHAFFER; HALLIWELL, 2012; KRASIEVA, et al., 2015). Dessa forma, o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos poderia melhorar as funções cognitivas, assim como reduzir o risco de demência ou mesmo afetar benéficamente outras funções associadas ao SNC (COMMENGES et al, 2000; NURK et al, 2009).

Estudos realizados com extratos ricos em antocianinas demonstraram a correlação existente entre compostos antociânicos e redução do déficit de memória, em modelo animal da Doença de Alzheimer (GUTIERRES, et al., 2014), bem como a capacidade desses compostos de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias e promover a produção de citocinas anti-inflamatórias no SNC (CARVALHO et al., 2016).

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos e apresentados no Capítulo 2 desta tese, especialmente aqueles relacionados ao potencial de captação de radicais livres dos extrato dos frutos vermelhos testados, foi possível inferir que tais extratos, ricos em compostos antociânicos, poderiam apresentar efeitos protetores do processo de neuroinflamação, visto que a produção de radicais livres e os processos inflamatórios estão diretamente relacionados (HUSSAIN; HARRIS 2007; PASHKOW, 2011; LEE; SONG; YEUM 2015).

Sendo assim, o presente capítulo apresenta os resultados da avaliação do extrato metanólico de *Rubus* sp. relativa à potencial capacidade do mesmo de prevenir os efeitos neuroinflamatórios induzidos pela administração intraperitoneal de lipopolissacarídeo (LPS), em modelo de neuroinflamação em camundongos.

### **4.2 OBJETIVOS**

#### **4.2.1 Objetivo geral**

Avaliar a capacidade do extrato metanólico dos frutos da amora-preta de prevenir os efeitos neuroinflamatórios, em camundongos Swiss, induzidos pela administração intraperitoneal de LPS.

#### **4.2.2 Objetivos específicos**

- Avaliar os níveis de TBARS nas estruturas cerebrais córtex, hipocampo e estriado dos animais.
- Avaliar o conteúdo tiólicico total nas estruturas cerebrais citadas.
- Avaliar o conteúdo de ROS nas estruturas cerebrais citadas.
- Avaliar o teor de nitrito/nitrato nas estruturas cerebrais citadas.
- Avaliar a atividade das enzimas SOD, CAT e GPx nas estruturas cerebrais citadas.
- Avaliar a produção das interleucinas 6 e 10 no soro dos camundongos.

### **4.3 METODOLOGIA**

#### **4.3.1 Protocolo experimental do modelo de neuroinflamação e tratamento com extrato de amora-preta**

Este estudo foi projetado para reproduzir o protocolo de prevenção do processo neuroinflamatório, conforme descrito por Carvalho e colaboradores (2016). Para isso, camundongos Swiss ( $n = 40$ ), machos, com peso de  $\pm 60$  g foram divididos em quatro grupos: solução salina + água, solução salina + extrato de amora-preta ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ ), LPS + água, LPS + extrato de amora-preta ( $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ ). Os grupos experimentais foram tratados com o extrato durante 14 dias por administração oral. No décimo quinto dia, os animais receberam solução salina ou solução de LPS em salina ( $250 \text{ } \mu\text{g.kg}^{-1}$ ) por via intraperitoneal e 24 h após a administração ocorreu a eutanásia. Todas as análises foram realizadas nas estruturas cerebrais dos camundongos (córtex, hipocampo e estriado), exceto as análises das citocinas que foram quantificadas no soro dos animais. Os experimentos foram conduzidos com a aprovação do Comitê de ética e experimentação da Univesidade Federal de Pelotas (protocolo número 3781/2016).

#### **4.3.2 Preparação do tecido cerebral e soro**

Os camundongos foram anestesiados e eutanasiados 24 h após a administração do LPS. O cérebro foi removido e o córtex, hipocampo e estriado foram separados manualmente, e homogeneizados em tampão de fosfato de sódio (pH 7,4) contendo KCl (1:10, p/v). Posteriormente, os homogeneizados foram centrifugados a  $2500 \times g$  durante 10 min a  $4^\circ\text{C}$ ,



os sobrenadantes imediatamente separados e utilizados para as medidas dos marcadores de estresse oxidativo. O sangue dos animais foi coletado e centrifugado por 10 min a 2500 x g para a separação do soro.

#### **4.3.3 Determinação de proteínas**

Para a análise dos parâmetros de estresse oxidativo, o doseamento de proteínas foi realizado como descrito por Lowry et al. (1951).

#### **4.3.4 Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)**

A peroxidação lipídica foi determinada pelo ensaio de TBARS. Para isso, os homogeneizados foram misturados com ácido tricloroacético 10% e ácido tiobarbitúrico 0,67% e depois aquecidos em banho-maria em ebulição durante 25 min. Após resfriamento, os precipitados foram removidos por centrifugação. A formação de TBARS foi determinada pela leitura das absorbâncias dos sobrenadantes a 535 nm. Os resultados foram expressos como nmol de TBARS por mg de proteína (ESTERBAUER; CHEESEMAN, 1990)

#### **4.3.5 Conteúdo tiólico total**

O conteúdo tiólico total foi determinado por meio do teor total de sulfidril, como descrito por Aksenov e Markesbery (2001). Resumidamente, às estruturas homogeneizadas foram adicionados o tampão PBS pH 7,4 contendo EDTA. A reação foi iniciada pela adição de 5,5'-ditio-bis (ácido 2-nitrobenzóico) (DTNB) e as absorbâncias foram medidas por espectrofotometria a 412 nm. Os resultados foram expressos como nmol TNB por mg de proteína.

#### **4.3.6 Medida de espécies reativas de oxigênio**

A oxidação do diacetato de dicloro-di-hidro-fluoresceína (DCFH-DA) em 2', 7'-diclorofluoresceína fluorescente (DCF) foi avaliada para a detecção de espécies reativas de oxigênio intracelulares. A intensidade da emissão de fluorescência pelo DCF foi registrada a 525 e 488 nm de excitação 30 min após a adição de DCFH-DA ao meio. A formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) foi expressa como  $\mu\text{mol}$  DCF por mg de proteína (ALI, et al., 1992).

#### **4.3.7 Atividade da superóxido dismutase**

Esta metodologia baseia-se na inibição da auto-oxidação da adrenalina dependente de superóxido para adenocromo, a qual é mensurada por espectrofotometria a 480 nm. A atividade total da superóxido dismutase (SOD) foi medida como descrito por Misra e Fridovich (1972) e a atividade específica da SOD foi expressa como unidades por mg de proteína.

#### **4.3.8 Atividade da catalase**

A atividade da catalase (CAT) foi determinada pelo método de Aebi (1984). Resumidamente, o desaparecimento de 30 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em tampão 50 mM fosfato de potássio (pH 7,0) foi monitorado espectrofotometricamente a 240 nm, durante 180 s, e temperatura de 37°C. Neste ensaio, uma unidade da enzima é definida como 1 nmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> consumido por minuto, e a atividade específica da CAT foi expressa como unidades por mg de proteína.

#### **4.3.9 Atividade da glutatona peroxidase**

A atividade da glutatona peroxidase (GPx) foi medida usando um kit comercial (RANSEL®; Randox Lab, Antrim, Reino Unido). Neste ensaio a GPx catalisa a oxidação da glutatona (GSH) em hidroperóxido de cumeno. Posteriormente, na presença da glutatona redutase (GR) e NADPH, a glutatona oxidada (GSSG) é imediatamente convertida na forma reduzida com a oxidação concomitante do NADPH para NADP<sup>+</sup>. A redução das absorvâncias foi monitorada a 340 nm, e a atividade específica da GPx foi expressa como unidades por mg de proteína.

#### **4.3.10 Teor de nitrito**

A produção de óxido nítrico (NO) foi medida pelo acúmulo de nitrito, considerado um indicador de NO (Stuehr, et al., 1989). Para este ensaio, os sobrenadantes foram usados na reação colorimétrica com o reagente de Griess (0,1% cloridrato de N-(1-naftil) etilenodiamina). Após, foram adicionados 50 µL de sulfanilamida em ácido fosfórico a 5% e as amostras foram então mantidas à temperatura ambiente durante 10 min. Na sequência, as amostras foram misturadas com 100 µL do reagente de Griess e incubadas durante 10 min, sob abrigo da luz. As absorvâncias

foram medidas por espectrofotometria a 540 nm, e o teor de de nitrito foi expresso como  $\mu\text{mol}$  de nitrito por  $\text{mg}$  de proteína.

#### **4.3.11 Análise de citoquinas**

Os níveis séricos das interleucinas IL-6 e IL-10 foram medidos utilizando kits de imunoenensaio (DuoSet ELISA Development, R & D Systems, Inc., EUA), de acordo com as instruções do fabricante. A presença e a concentração das citocinas foram determinadas por intermédio da intensidade da cor medida por espectrometria em um microleitor de ELISA.

#### **4.3.12 Análise estatística**

As comparações entre os grupos experimentais foram realizadas por análise de variância unidirecional (ANOVA) seguida do pós teste de Tukey. Os valores são expressos como média  $\pm$  erro padrão da média.  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

### **4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

O presente estudo avaliou a capacidade preventiva do extrato de amora-preta em controlar o processo neuroinflamatório induzido pelo LPS. Conforme previamente descrito no capítulo 2 do presente trabalho, o extrato de amora-preta apresenta em sua composição alta concentração de antocianinas, compostos cuja capacidade de atravessar a barreira hematoencefálica e agir nas estruturas cerebrais foram previamente demonstrados (TALAVERA, et al., 2005).

Segundo Dantzer e colaboradores (2008), o processo neuroinflamatório é capaz de elevar os níveis das citocinas e dos marcadores do estresse oxidativo, e desencadear uma disfunção neuronal evoluindo para uma consequente perda da capacidade cognitiva. Dessa forma, a avaliação dos parâmetros de estresse oxidativo bem como das citocinas inflamatórias, permitem realizar uma avaliação da capacidade preventiva do extrato de amora-preta no processo inflamatório e inferir o potencial preventivo desse extrato em um quadro de neuroinflamação.

#### 4.4.1 Parâmetros de estresse oxidativo no córtex cerebral de camundongos

O perfil dos marcadores de estresse oxidativo obtido após administração do LPS no córtex cerebral mostrou alterações nos marcadores, sugerindo o desenvolvimento de um quadro de estresse oxidativo. Os resultados obtidos estão de acordo com os de Swarnkar e colaboradores (2009) e Abdel-Salam e colaboradores (2014), os quais observaram um aumento nos parâmetros de estresse oxidativo em ratos após a administração do LPS.

Por meio do ensaio de TBARS pode-se avaliar a peroxidação lipídica pela quantificação do malondialdeído formado, que é proveniente do rompimento da membrana celular (JANERO, 1990). Os resultados obtidos apresentaram-se elevados nos animais do grupo que recebeu apenas o LPS, enquanto que o grupo pré-tratado com o extrato de amora-preta não apresentou essa característica ( $F_{(1,13)} = 8,36, p < 0.05$ ) (Figura 8). Esses resultados corroboram os de Carvalho e colaboradores (2016), que obtiveram resultados semelhantes na avaliação do perfil de prevenção do extrato de uva, em modelo animal de neuroinflamação induzida por LPS.

Outro parâmetro de estresse oxidativo avaliado foi o conteúdo total tiólico total. Os compostos tiólicos são antioxidantes que apresentam em sua estrutura o grupamento sulfidril, os quais são capazes de captar os radicais livres, especialmente quelando íons metálicos (WLODEK, 2010). Os resultados obtidos indicaram que o conteúdo tiólico total não foi alterado em nenhum grupo testado ( $p < 0.05$ ).

Todavia, em relação à produção de ROS, ocorreu um aumento significativo nos níveis desse marcador nos animais expostos ao LPS, enquanto que o pré-tratamento com extrato de *Rubus* sp. evitou este aumento ( $F_{(1,13)} = 7,04, p < 0.05$ ). A avaliação da produção de ROS tem por objetivo mensurar as espécies reativas de oxigênio intracelulares, as quais podem gerar danos celulares, dentre os quais é possível destacar os danos à membrana celular bem como a proteínas intracelulares.

Nos animais que receberam LPS também foi observada uma elevação nos níveis de nitrato/nitrito, alteração essa que não foi encontrada nos animais tratados com o extrato de amora-preta ( $F_{(1,12)} = 8,27, p < 0.05$ ). Essa análise é importante para avaliar o dano oxidativo mediado por espécies reativas de nitrogênio (ERN), que são radicais formados a partir do metabolismo do óxido nítrico (NO), e que em presença de  $O_2$  formam peroxinitrito ( $ONOO^-$ ), um radical que pode reagir com macromoléculas celulares tornando-as deletérias (VANCONCELOS, et al., 2007).

A avaliação da atividade das enzimas SOD, CAT e GPx também foi investigada. As enzimas endógenas têm função de realizar a defesa antioxidante, sendo que a SOD remove o radical superóxido convertendo-o em peróxido de hidrogênio. Já a CAT e a GPx têm a função de reduzir o peróxido de nitrogênio neutralizando completamente os radicais livres (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1995). Os resultados obtidos indicaram que a atividade da SOD e GPx não foi alterada em nenhum grupo testado ( $p < 0.05$ ), embora a atividade da CAT tenha sido reduzida pela administração do LPS, enquanto que o pré-tratamento com o extrato de amora-preta foi capaz de evitar esta redução ( $F_{(3,15)} = 3,99, p < 0.05$ ).

Sendo assim, os resultados demonstram que o extrato avaliado pode atuar no córtex cerebral em diferentes vias, mitigando possíveis danos às membranas celulares, bem como auxiliando a prevenir a redução da atividade da enzima endógena CAT, que participa do processo antioxidante.

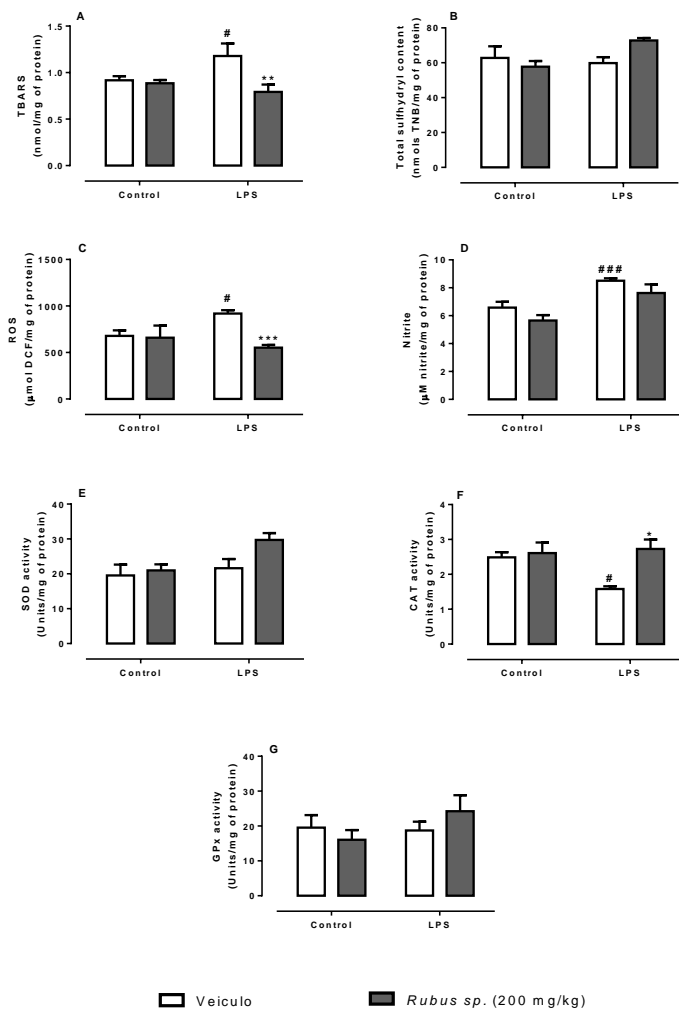


Figura 8 - Efeitos do extrato de amora-preta (*Rubus sp.*, 200 mg/kg, via oral) em camundongos expostos ao LPS (250 μg/kg, via i.p.) sobre o estresse oxidativo no córtex cerebral.

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão (n = 4-5). #  $p < 0,05$ ; ###  $p < 0,001$ , em comparação com o controle/veículo. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , em comparação com o LPS/veículo.

#### 4.4.2 Parâmetros de estresse oxidativo no hipocampo de camundongos

Da mesma forma, a avaliação da prevenção dos possíveis danos oxidativos foi realizada no hipocampo, tendo sido observados indícios de prevenção das alterações oxidativas, o que confirma *in vivo* a capacidade antioxidante detectada *in vitro* do extrato de amora-preta (Capítulo 2).

A avaliação dos efeitos do extrato revelou também que a exposição ao LPS determinou um aumento nos níveis de TBARS. Por outro lado, o pré-tratamento com o extrato de amora-preta foi capaz de prevenir esta alteração ( $F_{(3,12)} = 8,36, p < 0.05$ ).

A administração do LPS também induziu um aumento nos níveis de ROS. No entanto, o pré-tratamento com o extrato de amora-preta não foi capaz de prevenir esta alteração ( $F_{(3,12)} = 5,37, p < 0.05$ ). Por outro lado, a administração do extrato (200 mg/kg) foi capaz de prevenir a redução do conteúdo tiólico total após a administração do LPS, enquanto que o grupo que recebeu apenas LPS apresentou uma redução no conteúdo tiólico total ( $F_{(3,12)} = 12,54, p < 0.05$ ).

A avaliação dos níveis de nitrito/nitrato indicou uma diminuição dos mesmos nos animais do grupo que recebeu LPS associado ao pré-tratamento com o extrato, quando comparada com os níveis dos animais controle ( $F_{(3,12)} = 13,83, p < 0.05$ ).

Por fim, a atividade das enzimas SOD e CAT foi reduzida nos animais que receberam LPS, enquanto que o pré-tratamento com o extrato de amora-preta não evitou a redução da atividade enzimática gerada pelo LPS ( $p < 0.05$ ). A atividade da GPx não foi alterada em nenhum grupo testado ( $p < 0.05$ ) (Figura 9).

Os resultados observados no hipocampo sugerem que a proteção ao dano oxidativo está relacionada com a prevenção aos danos das membranas e a proteínas intracelulares, visto que os resultados das análises de TBARS e conteúdo tiólico foram compatíveis com o que ocorre em um processo antioxidante. Por outro lado, o extrato de amora-preta não foi capaz de prevenir a redução da atividade das enzimas SOD e CAT induzida pelo LPS.

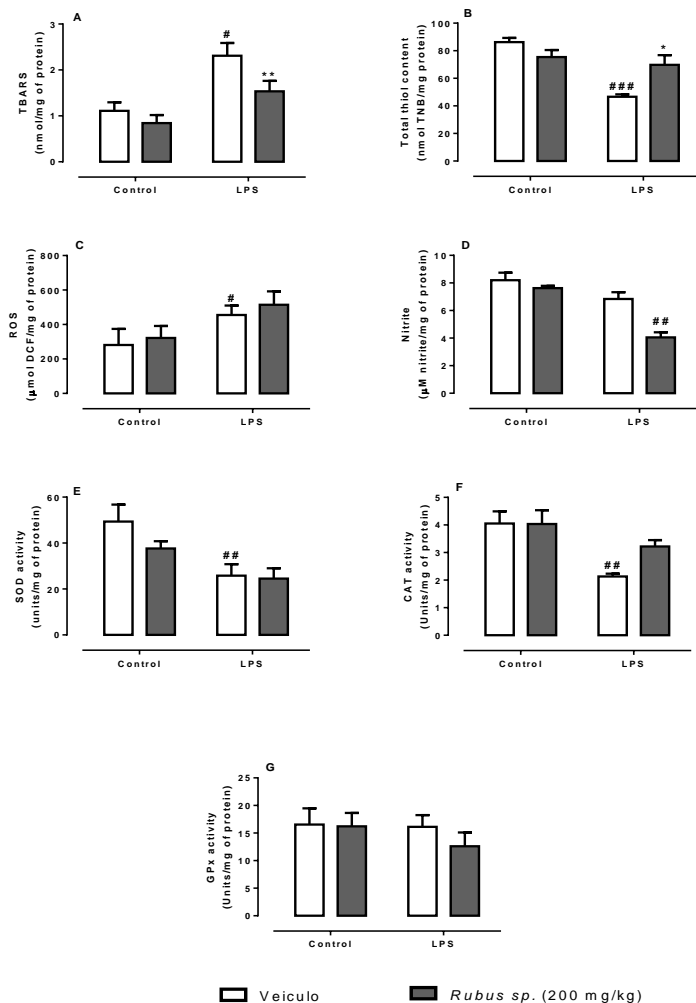


Figura 9 - Efeito do extrato de amora-preta (*Rubus sp.*, 200 mg/kg, via oral) em camundongos expostos ao LPS (250 μg/kg, via i.p.) sobre o estresse oxidativo no hipocampo.

Os resultados estão expressos como média ± erro padrão (n = 4-5). #  $p < 0,05$ ; ###  $p < 0,001$ , em comparação com o controle/veículo. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , em comparação com o LPS/veículo.



#### 4.4.3 Parâmetros de estresse oxidativo no estriado de camundongos

Também foram avaliados os marcadores de estresse oxidativo no estriado, conforme demonstrado na Figura 10. A análise estatística mostrou um aumento significativo dos níveis de TBARS no grupo exposto ao LPS. No entanto, o aumento nos níveis de TBARS não foi evitado nos animais pré-tratados com o extrato ( $F_{(3,12)} = 10,97, p < 0.05$ ).

A análise dos níveis de ROS mostrou que os mesmos estavam aumentados nos animais expostos ao LPS, enquanto que nos animais do grupo, que recebeu o LPS concomitantemente ao pré-tratamento com o extrato de amora-preta, não foi detectado aumento nos níveis de ROS ( $F_{(3,13)} = 6,43, p < 0.05$ ).

A administração do LPS induziu, ainda, uma redução no conteúdo tiólic total, enquanto que no o grupo dos animais pré tratados com o extrato e o LPS houve prevenção da redução desse parâmetro ( $p < 0.05$ ). A avaliação dos níveis de nitrito/nitrato não foram alterados em nenhum grupo testado ( $p < 0.05$ ).

Especificamente em relação à atividade das enzimas SOD/CAT e GPx, nos camundongos tratados com LPS houve redução da atividade da SOD ( $F_{(3,13)} = 6,77, p < 0.05$ ) e da CAT ( $F_{(3,12)} = 10,40, p < 0.05$ ), enquanto que o pré-tratamento com o extrato foi capaz de prevenir a diminuição da atividade de ambas as enzimas. Por fim, a avaliação da atividade da GPx nos animais expostos ao LPS associado ao tratamento com o extrato de amora-preta mostrou que o meso não foi capaz de preservar a atividade normal da GPX, a qual foi reduzida pelo LPS ( $p < 0.05$ ).

A avaliação da atividade preventiva do extrato de amora-preta apresentou resultados no estriado que sugerem diferentes vias de neutralização do estresse oxidativo. As enzimas endógenas SOD e CAT tiveram sua atividade preservada, assim como o conteúdo tiólic total, que foi mantido, prevenindo assim possíveis danos a proteínas celulares. Além disso, o extrato de amora-preta impediu a elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio nesta região cerebral.

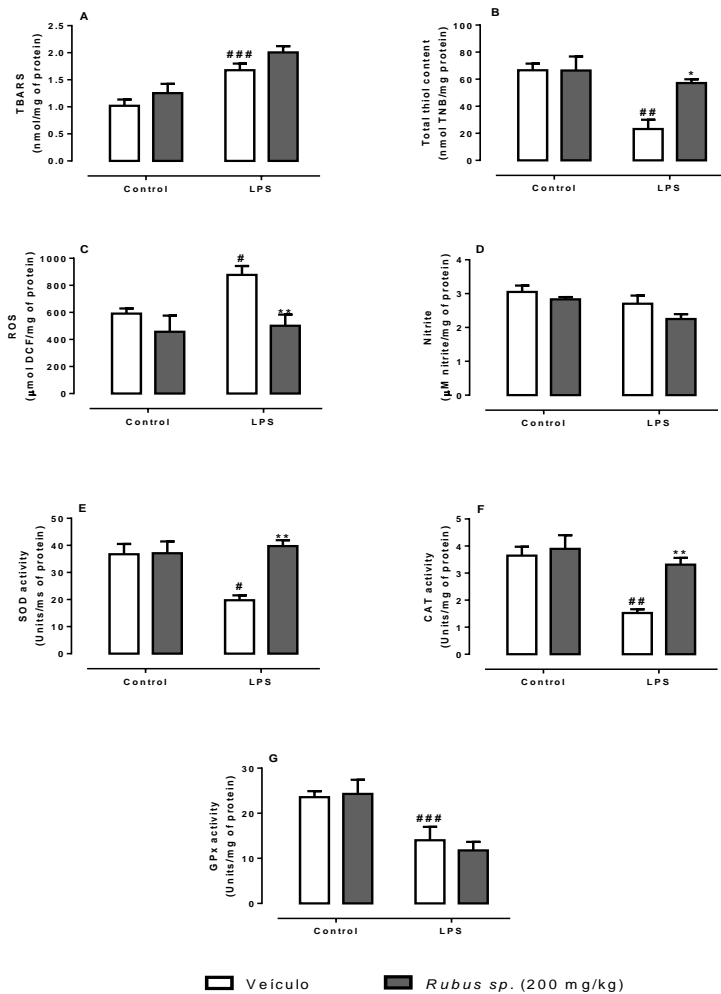


Figura 10 - Efeito do extrato de amora-preta (*Rubus sp.*, 200 mg/kg, via oral) em camundongos expostos ao LPS (250  $\mu\text{g/kg}$ , via i.p.) sobre o estresse oxidativo no hipocampo.

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão (n = 4-5). #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ ; ###  $p < 0,001$ , em comparação com o controle/veículo. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ , em comparação com o LPS/veículo.

#### 4.4.4 Níveis séricos das citocinas IL-6 e IL-10

A administração periférica de LPS tem por objetivo induzir um processo neuroinflamatório, o qual a partir do reconhecimento pelo sistema imune provocaria uma resposta pró-inflamatória (ZHANG; GHOSH, 2000). Diversos estudos utilizam essa premissa para a realização de experimentos utilizando lipopolissacarídeos, e resultados coerentes são observados, ou seja, o aumento de interleucinas pró-inflamatórias, como IL-1 $\beta$  e IL-6 (BREDEE, et al., 1994; QUAN, et al., 1999; CARVALHO, et al., 2016). Alguns aspectos como dose e o período de espera após a administração do LPS para a realização da avaliação são objetos de discussão, visto que doses baixas podem não acarretar alterações em períodos prolongados (LOPES, 2016).

Um estudo realizado por Tiward e colaboradores (2016) demonstrou que ratos que receberam LPS via ip não apresentaram alterações nos níveis de interleucinas no tecido cerebral 48 h após a injeção. Contudo, Carvalho e colaboradores (2016) detectaram alteração nos níveis da IL-6, 24 h após a administração do LPS no tecido cerebral de camundongos.

Os níveis séricos obtidos das interleucinas IL-6 e IL-10 não apresentaram diferenças significativas entre os grupos avaliados (Figura 11), fato que pode ser justificado pelo fato dessas análises terem sido realizadas no soro dos camundongos, que foram sacrificados 24 h após a administração do LPS. Além do período de espera para a eutanásia, a dose utilizada (250  $\mu\text{g.kg}^{-1}$ ) é outra variável que pode ser responsabilizada pela ausência de alterações na IL-6. Grande parte dos estudos realizados com camundongos descrevem alterações nos níveis de interleucinas pró-inflamatórias utilizando doses que oscilam entre 250 a 5.000  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  (LOPES, 2016).

Sendo assim, possivelmente, as variáveis tempo entre a administração do LPS e a eutanásia, além da dose e do tipo de amostra, podem ter influenciado diretamente nos resultados obtidos, uma vez que doses reduzidas parecem necessitar de um período de tempo menor de análise para que alterações sejam detectadas.

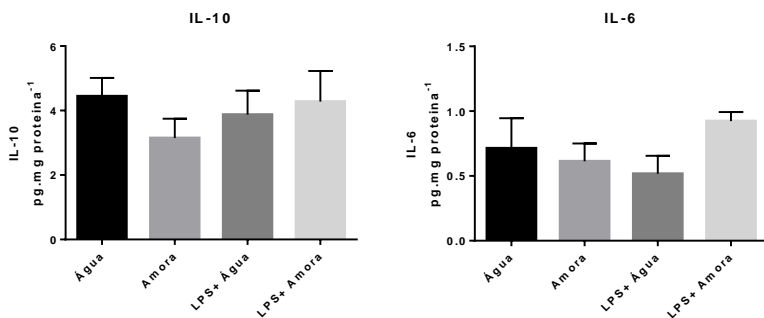


Figura 11 – Efeitos do extrato de amora-preta (*Rubus* sp.) nos níveis séricos das interleucinas IL-10 e IL-6.

Os resultados estão expressos como média  $\pm$  erro padrão ( $n = 5$ ). Foi realizada uma análise por ANOVA de uma via seguida do pós teste de Tukey para comparação dos resultados.

#### 4.5 CONCLUSÃO

O extrato de amora-preta apresentou propriedades antioxidantes *in vivo*, as quais foram observadas em diferentes tecidos cerebrais, e confirmadas pelos resultados obtidos dos níveis dos diferentes marcadores de estresse oxidativo avaliados. Dessa forma, é possível concluir que a prevenção obtida pela administração do extrato de amora-preta ocorreu por diferentes vias, seja prevenindo a redução da atividade das enzimas endógenas SOD e CAT, impedindo a formação de ROS ou a redução do conteúdo tiólico, ou ainda impedimento a peroxidação lipídica evidenciada pela manutenção do níves de TBARS. Contudo, os níveis das citocinas IL-6 e IL-10 não foram alterados, o que pode ser justificado pelo fato das análises terem sido realizadas em soro sanguíneo, além do tempo de 24h aguardado para a eutanásia dos animais. Possivelmente, se um tempo menor tivesse sido usado, teria-se observado alguma alteração. Apesar disso, o extrato de amora-preta apresenta propriedades atenuantes do processo neuroinflamatório, atuando na prevenção dos danos celulares causados pelo estresse oxidativo.

## REFERÊNCIAS

ABDEL-SALAM, O. M.; YOUNESS, E. R.; MOHAMMED, N. A.; MORSY, S. M.; OMARA, E. A.; SLEEM, A. A. Citric acid effects on brain and liver oxidative stress in lipopolysaccharide-treated mice. *J Med Food* 17(5):588–598, 2014.

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

AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neuroscience Letters*, v. 302, p. 141–145, 2001.

ALI, S. F.; LEBEL, C. P.; BONDY, S. C. Reactive oxygen species formation as a biomarker of methylmercury and trimethyltin neurotoxicity. *Neurotoxicology*, v. 13, p. 637–648, 1992.

BREDER, C.D. Regional induction of tumor necrosis factor alpha expression in the mouse brain after systemic lipopolysaccharide administration. *Proc Natl Acad Sci USA* 91:11393–11397, 1994.

CARVALHO, F. B.; GUTIERRES, J. M.; BUENO, A.; AGOSTINHO, P.; ZAGO, A. M.; VIEIRA, J.; FRÜHAUF, P.; CECHELLA, J. L.; NOGUEIRA, C. W.; OLIVEIRA, S. M.; RIZZI, C.; SPANEVELLO, R. M.; DUARTE, M. M. F.; DUARTE, T.; DELLAGOSTIN, O. A.; ANDRADE, C. M. Anthocyanins control neuroinflammation and consequent memory dysfunction in mice exposed to lipopolysaccharide. *Mol Neurobiol*, 54:3350-3367, 2016.

COMMENGES, D.; SCOTET, V.; RENAUD, S.; JACQMIN-GADDA, H.; BARBERGER-GATEAU, P.; DARTIGUES, J. F. Intake of flavonoids and risk of dementia. *Eur. J. Epidemiol.* 16 (4), 357e363, 2000.

DANTZER, R.; O'CONNOR, J. C.; FREUND, G. G.; JOHNSON, R. W.; KELLEY, K. W. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. *Nat Rev Neurosci* 9(1):46–56, 2008.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K. H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. *Methods in Enzymology*, v. 186, p. 407–421, 1990.

GUTIERRES, J.M.; CARVALHO, F.B.; SCHETINGER, M.R.C.; MARISCO, P.; AGOSTINHO, P.; RODRIGUES, M.; RUBIN, M.A.; SCHMATZ, R.; SILVA, C.R.; COGNATO, G.P.; FARIAS, J.G.; SIGNOR, C.; MORSCH, V.M.; MAZZANTI, C.M.; BOGO, M.; BONAN, C.D.; SPANEVELLO, R. Anthocyanins restore behavioral and biochemical changes caused by streptozotocin-induced sporadic dementia of Alzheimer's type. *Life Sci.* 96 (1), 7–17, 2014.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. *Free Radical Biology and Medicine*, v.18, n.1, p.125-126, 1995.

HUSSAIN, S. P.; HARRIS, C. C. Inflammation and cancer: an ancient link with novel potentials. *Int J Cancer*, 121(11): 2373–2380, 2007.

JANERO, D. R. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 9, pp. 515-540, 1990.

KRASIEVA, T.B.; EHREN, J.; O'SULLIVAN, T.; TROMBERG, B.J.; MAHER, P. Cell and brain tissue imaging of the flavonoid fisetin using label-free two-photon microscopy. *Neurochem. Int.* 89, 243e248, 2015.

LEE, Y. M.; SONG, B. C.; YEUM, K. J. Impact of Volatile Anesthetics on Oxidative stress and Inflammation. *Biomed Res Int*, 2015.

LOPES, P. C. LPS and neuroinflammation: a matter of timing. *Inflammopharmacology*, 2016.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 193, p. 265–275, 1951.

MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *The Journal of Biological of Chemistry*, v. 247, p. 3170–3175, 1972.

NURK, E.; REFSUM, H.; DREVON, C. A.; TELL, G.S.; NYGAARD, H.A.; ENGEDAL, K.; SMITH, A.D. Intake of flavonoid-rich wine, tea, and chocolate by elderly men and women is associated with better cognitive test performance. *J. Nutr.* 139 (1), 120e127, 2009.

PASHKOW, F. J. Oxidative stress and inflammation in heart disease: do antioxidants have a role in treatment and/or prevention. *Int J Inflamm.* 2011:514623, 2011.

QUAN, N.; STERN, E.L.; WHITESIDE, M.B.; HERKENHAM, M. Induction of pro-inflammatory cytokine mRNAs in the brain after peripheral injection of subseptic doses of lipopolysaccharide in the rat. *J Neuroimmunol* 93:72–80, 1999.

SCHAFFER, S.; HALLIWELL, B. Do polyphenols enter the brain and does it matter: Some theoretical and practical considerations. *Genes Nutr.* 7 (2), 99e109, 2012.

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

TALAVERA. S.; FELGINES, C.; TEXIER, O.; BESSON, C.; GIL-IZQUIERDO, A.; LAMAISON, J. L.; REMESY, C. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *J Agric Food Chem* 53(10):3902–3908, 2005.

TIWARI, V.; SINGH, M.; RAWAT, J.K.; et al *Inflammopharmacology*, 2016.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULARTII, M. O. F.; MOURA, J. B. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M.S.; KUBOTA, L.T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. *Quím. Nova* 30(5): 1323-1338, 2007.

WARNKAR, S.; TYAGI, E.; AGRAWAL, R.; SINGH, M. P.; NATH, C. A comparative study on oxidative stress induced by LPS and rotenone in homogenates of rat brain regions. *Environ Toxicol Pharmacol* 27(2):219–224, 2009.

WŁODEK, P.; MARCYKIEWICZ, B.; ICIEK, M.; SULIGA, M.; SMOLEŃSKI, O.; KOWALCZYK-PACHEL, D. Thiol levels, protein carbonylation and anaerobic sulfur metabolism in erythrocytes of peritoneal dialysis and predialysis patients. *Nephrology*. 15(8):755-61, 2010.

ZHANG, G.; GHOSH, S. Molecular mechanisms of NF-kappaB activation induced by bacterial lipopolysaccharide through Tolllike receptors. *J Endotoxin Res* 6:453–457, 2000.



## 5. DISCUSSÃO GERAL

O consumo de alimentos funcionais para a prevenção de diversas patologias mostra a estreita relação existente entre alimentação e saúde. Esses alimentos destacam-se por apresentarem em sua composição química compostos com atividades farmacológicas comprovadas, ou mesmo indícios de possíveis efeitos benéficos ao organismo (KHAN, et al., 2013).

Dentre as muitas classes de alimentos classificados como funcionais, os frutos vermelhos apresentam destaque no cenário mundial (RODRIGUES, et al., 2012). Muitos desses frutos são bastante estudados, devido ao seu amplo cultivo, em diferentes locais. Dentre os frutos amplamente cultivados pode-se destacar os frutos de mirtilo (*Vaccinium virgatum*), morango (*Fragaria x ananassa*) e amora-preta (*Rubus* sp.), objetos de estudo da presente tese. Não menos importantes, há frutos que apresentam características de cultivo e consumo regionais, ou até mesmo aqueles que são nativos, e que apresentam um amplo potencial de estudo, visto que sua composição química e potenciais atividades farmacológicas são pouco exploradas. Nessa classificação, encontram-se os frutos de araçá (*Psidium cattleianum*) e pitanga (*Eugenia uniflora*), que tem um potencial enorme a ser desbravado e, por isso, também foram objetos de estudo desta tese.

Os frutos de mirtilo, morango e amora-preta, assim como os de araçá e pitanga, foram avaliados quanto aos seus teores quali- e quantitativos de compostos antociânicos. Muitos dos compostos antociânicos detectados nos frutos com cultivos amplamente difundidos já haviam sido anteriormente relatados (SEERAM, et al, 2006; VEBERIC, et al., 2015; HE, et al., 2016). Assim, foram identificados quatro compostos antociânicos nos frutos de morango (cianidina-*O*-glicosídeo, pelargonidina-*O*-glicosídeo, pelargonidina-*O*-rutinosídeo e carboxipiranopelargonidina-*O*-hexosídeo), enquanto que nos frutos de amora-preta foi possível detectar a presença de cinco antocianinas: cianidina-*O*-galactosídeo, cianidina-*O*-glicosídeo, cianidina-*O*-rutinosídeo, pelargonidina-*O*-glucosídeo e cianidina-*O*-malonilhexosídeo. Já nos frutos de mirtilo foi possível detectar a presença de 15 compostos: delfinidina-*O*-galactosídeo, delfinidina-*O*-glicosídeo, cianidina-*O*-galactosídeo, delfinidin-*O*-pentosídeo, cianidina-*O*-glicosídeo, petunidina-*O*-galactosídeo, petunidina-*O*-glicosídeo, cianidina-*O*-pentosídeo, peonidina-*O*-galactosídeo, petunidina-*O*-pentosídeo, peonidina-*O*-glicosídeo, malvidina-*O*-galactosídeo, malvidina-*O*-glicosídeo, peonidina-*O*-pentosídeo e malvidina-*O*-

pentosídeo. Os frutos de mirtilo apresentaram a matriz mais complexa de antocianinas dentre os frutos estudados.

Contudo, nos frutos de pitanga e araçá foram detectados: nove compostos antociânicos nos frutos da pitanga-vermelha (delfinidina-*O*-galactosídeo, delfinidina-*O*-glicosídeo, cianidina-*O*-galactosídeo, cianidina-*O*-glicosídeo, petunidina-*O*-galactosídeo, pelargonidina-*O*-glucosídeo, malvidina-*O*-galactosídeo, malvidina-*O*-pentosídeo e malvidina-*O*-acetilhexosídeo) e cinco nos frutos da pitanga-roxa (delfinidina-*O*-galactosídeo, delfinidina-*O*-glicosídeo, cianidina-*O*-galactosídeo, cianidina-*O*-glicosídeo e pelargonidina-*O*-glucosídeo). Já nos frutos do araçá foi detectada a presença apenas da cianidina-*O*-glicosídeo, composto identificado pela primeira vez nessa espécie.

O perfil quantitativo dos compostos antociânicos analisados mostrou que os frutos de mirtilo apresentaram o maior teor (120 mg.100 g<sup>-1</sup> de fruto fresco), enquanto que os frutos de araçá da variedade amarela foram os que apresentaram a menor concentração (0,04 mg.100 g<sup>-1</sup> de fruto fresco). Os teores de antocianinas mostraram-se fortemente correlacionados com a capacidade de captação de radicais livres, a qual foi mensurada por meio dos ensaios *in vitro* com os radicais DPPH e ABTS.

Sendo assim, a partir não somente dos resultados obtidos *in vitro*, em relação ao potencial de captar radicais livres, mas também da capacidade já descrita de compostos fenólicos em cruzar a barreira hematoencefálica e atuar em doenças neurológicas (SUBASH, et al., 2014; GAZAL, et al., 2015; DEBOM, et al., 2016) foram desenvolvidos experimentos *in vivo* focando a avaliação de parâmetros de estresse oxidativo e inflamatório em estruturas cerebrais.

Desta forma, o extrato de amora-preta, mirtilo e pitanga roxa, os quais apresentaram os maiores teores de antocianinas, foram os candidatos para estudos *in vivo*. Dentre esses, os frutos de mirtilo já haviam sido estudados em modelo de mania (DEBOM, et al., 2016) e os frutos de pitanga roxa não foram obtidos em quantidade suficiente para realização de estudos dessa ordem. Sendo assim, os frutos de amora-preta foram os escolhidos para avaliação em dois modelos animais: um de mania em ratos e outro de neuroinflamação em camundongos.

O modelo de mania induzido por cetamina demonstrou que a ingestão preventiva do extrato de amora-preta foi capaz de prevenir os danos celulares causados por estresse oxidativo. Diferentes vias de atuação no estresse oxidativo foram observadas, tais como a ação sobre a peroxidação lipídica, redução na formação de espécies reativas de oxigênio intracelular, bem como o impedimento da redução da atividade

das enzimas SOD e CAT. Em relação à análise dos níveis séricos das citocinas IL-6 e IL-10, foi observado uma redução da IL-6 (pró-inflamatória), embora somente no estriado tenha sido observado um aumento significativo da IL-10 (anti-inflamatória). Sendo assim, o extrato da amora-preta apresentou resultados promissores no que diz respeito à prevenção de alterações cerebrais em ratos induzidos ao comportamento maníaco com proteção expressiva aos danos oxidativos.

Da mesma forma, visando a avaliar o perfil da atividade protetora do extrato de amora-preta foram analisadas algumas estruturas cerebrais de camundongos submetidos a um processo neuroinflamatório induzido por LPS. Os resultados apontaram um perfil antioxidante com base nos resultados da avaliação de parâmetros do estresse oxidativo.

## 6. CONCLUSÕES GERAIS

- O extrato de morango cultivar Aromas apresentou o maior teor de fenólicos totais (13,55 mg.g<sup>-1</sup> de fruto fresco), enquanto que o extrato do araçá amarelo foi o que exibiu o menor teor (13,55 mg.g<sup>-1</sup> de fruto fresco).
- O teor de antocianinas totais foi quantificado nos extratos metanólicos dos frutos, sendo que os de mirtilo apresentaram o maior teor (120 mg.100 g<sup>-1</sup> de fruto fresco), enquanto que os frutos do araçá amarelo o menor teor (0,04 mg.100 g<sup>-1</sup> de fruto fresco).
- As análises por CLAE/DAD/EM/EM permitiram a identificação de 21 antocianinas, das quais sete foram identificadas pela primeira vez em duas espécies. Delfinidina-*O*-galactosídeo, cianidina-*O*-galactosídeo, petunidina-*O*-galactosídeo, malvidina-*O*-galactosídeo, malvidina-*O*-pentosídeo e malvidina-*O*-acetilhexosídeo nos frutos de *Eugenia uniflora* e cianidina-*O*-glicosídeo nos frutos da espécie *Psidium cattleinum*.
- Os ensaios com os radicais DPPH e ABTS apresentam potencial de captação de radicais livres, e as concentrações mais baixas de EC<sub>50</sub> foram detectadas para os extratos dos frutos de mirtilo, amora-preta e pitanga-roxa.

- As análises *in vitro* de citotoxicidade realizadas nas linhagens celulares tumorais humanas DU145, A549 e RD não mostraram atividade promissora até a concentração de 0,5 mg.mL<sup>-1</sup>.
- Os ensaios realizados por meio da técnica de inibição do número das placas de lise não demonstraram atividade anti-herpética promissora.
- No modelo *in vivo* de mania foi observado potencial preventivo do extrato de amora-preta com relação à proteção ao dano oxidativo nas estruturas cerebrais, córtex, hipocampo e estriado, de ratos.
- As citocinas IL-6 e IL-10 foram avaliadas no soro dos ratos submetidos ao modelo de mania, tendo sido observada uma sutil redução do processo inflamatório, com redução da IL-6 e aumento da IL-10 nos animais tratados com extrato de amora-preta.
- No modelo de neuroinflamação induzida por LPS em camundongos, foi observado efeito protetor do extrato de amora-preta.
- A avaliação dos níveis séricos das citocinas no modelo de neuroinflamação não mostrou alterações significativas em nenhum dos grupos testados.

## REFERÊNCIAS

- ABE, K. Functional food science in Japan: Present state and perspectives. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, 61, S201, 2015.
- ALUKO, R. Editorial overview: Functional foods and nutrition. *Current Opinion in Food Science*, 2016.
- BERNARDES, L.C.B.; LANG, K.L.; PETROVICK, P. R.; SCHENKEL, E. P. Produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos. In: *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed, 107-128, 2017.
- BRAGA, F.C.; RATES, S.M.K.; SIMÕES, C.M.O. Avaliação da eficácia e segurança de produtos naturais candidatos a fármacos e medicamentos. In: *Farmacognosia: do produto natural ao medicamento*. Artmed, 53-68, 2017.
- DEBOM, G., GAZAL, M., SOARES, M. S. P., COUTO, C. A. T., MATTOS, B., LENCINA, C., KASTER, M. P., GHISLENI, G. C., TAVARES, R., BRAGANHOL, E., CHAVES, V. C., REGINATTO, F. H., STEFANELLO, F., SPANEVELLO, R. M. Preventive effects of blueberry on behavioral and biochemical dysfunctions in rats submitted to a model of manic behavior induced by ketamine. *Brain Res. Bull.* 127, 260 – 269, 2016.
- FOGLIANO, V.; VITAGLIONE, P. Functional foods: Planning and development. *Molecular Nutrition and Food Research*, v.49, n.3, p.256-262, 2005.
- GAZAL, M., KAUFMANN, F. N., ACOSTA, B. A., OLIVEIRA, P. S., VALENTE, M. R., ORTAMANN, C. F., STURBELLE, R., LENCINA, L. C., STEFANELLO, F. M., KASTER, M. P., REGINATTO, F. H., GHISLENI, G. Preventive Effect of *Cecropia pachystachya* Against Ketamine-Induced Manic Behavior and Oxidative Stress in Rats. *Neurochem Res.* 40 (7), 1421 – 1430, 2015.
- GUL, K.; SINGH, A. K.; JABEEN, R. Nutraceuticals and Functional Foods: The Foods for the Future World. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. v. 56 (16), 2617-2627, 2016.
- HE, B.; ZHANG, L. L.; YUE, X. Y. Optimization of Ultrasound-Assisted Extraction of phenolic compounds and anthocyanins from blueberry (*Vaccinium ashei*) wine pomace. *Food Chemistry*, v.204, p.70-76, 2016.

HUNTER, P. M.; HEGELE, R. A. Functional foods and dietary supplements for the management of dyslipidaemia. *Nature Reviews Endocrinology*, 13, 278-288, 2017.

KAUR, S.; DAS, M. Functional foods: An overview. *Food Science and Biotechnology*, v.20, n.4, p.861-875, 2011.

KHAN, N.; SYED, D. N.; AHMAD, N. Fisetin: A dietary antioxidant for health promotion. *Antioxidants and Redox Signaling*, v.19, n.2, p.151-162, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, v.79, n.3, p.629-661, 2016.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T. A. P.; FREITAS, A. C. Analytical strategies for characterization and validation of functional dairy foods. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v.41, p.27-45, 2012.

SCHIEBER, A. Functional Foods and Nutraceuticals. *Food Research International*, v.46, n.2, p.437, 2012.

SEERAM, N. P. Bioactive polyphenols from foods and dietary supplements: Challenges and opportunities. *ACS Symposium Series*. 925: 25-38 p. 2006.

SUBASH, S.; ESSA, M.M.; AL-ADAWI, S.; MEMON, M.A.; MANIVASAGAM, T.; AKBAR, M. Neuroprotective effects of berry fruits on neurodegenerative diseases. *Neural Regen. Res.* 9 (16), 1557–1566, 2014.

VEBERIC, R.; SLATNAR, A.; BIZJAK, J. Anthocyanin composition of different wild and cultivated berry species. *LWT - Food Science and Technology*, v.60, n.1, p.509-517, 2015.

WILSON, D. W.; NAH, P.; SINGH, H.; GIFFITHS, K.; SINGH, R.; DE MEESTER, F.; HORIUCHI, R.; TAKAHASHI, T. The role of food antioxidants, benefits of functional foods, and influence of feeding habits on the health of the older person: An overview. v.6, 81, 2017.

YILDIZ, O.; EYDURAN, S. P. Functional components of berry fruits and their usage in food technologies. *African Journal of Agricultural Research*, v.4, n.5, p.422-426, 2009.

## 7. APÊNDICE

Cromatograma de extrato de frutos de mirtilo, utilizado como exemplo, por tratar-se do extrato com maior complexidade de antocianinas.

