

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Análise química e avaliação das atividades biológicas e comportamentais de extratos de frutas ricas em compostos fenólicos (Mirtilo e Amora-Preta)

MARIA ROSANA RAMIREZ

Porto Alegre, agosto de 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Análise química e avaliação das atividades biológicas e comportamentais de extratos de frutas ricas em compostos fenólicos (Mirtilo e Amora-Preta)

Tese apresentada por **Maria Rosana Ramirez** para obtenção do TÍTULO DE DOUTOR em Ciências Farmacêuticas

Orientadora: Prof. Dra. Amélia T. Henriques
Co-Orientadora: Profa. Dra. Daniela Martí Barros

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 18.08.2007, pela Comissão Examinadora constituída por:

Profa Dra. Marcia Maria de Souza
Universidade do Vale do Itajaí

Prof. Dra. Maria Teresinha Antunes
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

Prof. Dr. Jose Ângelo Zuanazzi
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

R173a	Ramirez, Maria Rosana Análise química e avaliação das atividades biológicas e comportamentais de extratos de frutas ricas em compostos fenólicos (mirtilo e amora-preta) / Maria Rosana Ramirez – Porto Alegre: UFRGS, 2008. – xviii, 223 p.: il., graf., tab. Tese (doutorado). UFRGS. Faculdade de Farmácia. Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas. 1. <i>Vaccinium ashei</i> 2. Mirtilo 3. Amora-Preta. <i>Rubus</i> . 5. Cromatografia líquida de alta eficiência. 6. Validação. 7. Polifenóis. I. Henriques, Amélia Teresinha. II. Barros, Daniela Martí. III. Título. CDU: 547.97
-------	---

Bibliotecária responsável:

Margarida Maria Cordeiro Fonseca Ferreira – CRB10/480

Heloísa do Canto Canabarro – CRB 10/1036

Este trabalho foi realizado no laboratório de Fitoquímica da Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, no Centro de Memória, Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, bem como no Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS.

AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal de Rio Grande do Sul, por me proporcionar meios e condições de um aprendizado de qualidade.

À professora Amélia T. Henriques, *pela rigidez e incentivo constantes e pelo exemplo de determinação, perseverança, e consciência de pesquisa básica.*

À Professora Daniela Marti Barros, pelas valiosas sugestões e questionamentos e por ter emprestado seu espaço para a realização de certas metodologias. Obrigada pelo apoio assim como o de seu pessoal.

Ao Embrapa: Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado (Pelotas), em particular a Maria do Carmo Bassols Raseira por confiarem a nós uma parte tão importante, a credibilidade e comprovação científica.

A CAPES e CNPq pela bolsa de estudos concedida durante o período da realização de minha tese e pela concessão de recursos para a pesquisa, tornando financeiramente viável todos os experimentos.

E, finalmente, a todos aqueles que, de uma forma ou de outra, contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho. Muito obrigada.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS	ix
LISTA DE FIGURAS E TABELAS	xi
RESUMO	xv
ABSTRACT	xvii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Contextualização	1
1.2 Objetivos	5
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1 Alimentos Funcionais	7
2.2 Nutracêuticos	8
2.3 Conceito e Definição Legal	10
2.4 Alimentos Funcionais e seus Componentes Bioativos	14
2.5 Histórico	16
2.6 Antioxidantes Naturais: compostos fenólicos	18
2.6.1 Compostos fenólicos na dieta	20
2.7 Frutas Vermelhas na Dieta	22
2.7.1 Estudos Promissores de Avaliação Cognitiva	22
2.7.2 Dieta Deficiente em Antioxidantes: Grupos vulneráveis	24
2.7.2.1 Idosos	24
2.7.2.2 Doença de Alzheimer: Uma abordagem nutricional	26
3 MIRTILO (<i>Vaccinium ashei</i> Reade)	27
4 AMORA-PRETA (<i>Rubus</i> sp.)	30
5 CAPÍTULO I	33
Introdução	35
5.1 Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for quantification of anthocyanidins in blackberry (<i>Rubus</i> sp.) and blueberry (<i>Vaccinium ashei</i>) cultivars	39

5.2 Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for quantification of flavonoids in berries	53
6 CAPÍTULO II	65
Introdução	67
6.1 Radical Scavenging Activity and Neuroprotective Effects of <i>Vaccinium ashei</i> Berries Intake in old Rats	71
7 CAPÍTULO III	85
Introdução	87
7.1 Antinociceptive Effect of <i>Vaccinium</i> Berries Intake in Mice	95
8 CAPÍTULO IV	113
Introdução	115
8.1 Effect of lyophilised <i>Vaccinium</i> berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats	123
8.2 Behavioural and genoprotective effects of <i>Vaccinium</i> berries intake in mice	129
8.3 Efeitos benéficos da suplementação com mirtilo no Sistema Nervoso Central: comparação entre ratos adultos e ratos velhos	135
9 CAPITULO V	147
Introdução	149
9.1 Antioxidant and Chemotaxis activity of different phenolic fractions separated from Blackberry (<i>Rubus</i> sp.)	155
9.2 Effects of Cyanidin 3-Glucoside on Neuroprotection in Rats	171
10 DISCUSSÃO	177
10.1 Considerações finais	188
11 CONCLUSÕES	191
REFERÊNCIAS	197
ANEXOS	215

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

Ac- ácido

AF- alimentos funcionais

AMPc - adenosina monofosfato cíclico

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ANOVA - análise de variância

ATP - adenosina trifosfato

Ca²⁺ATPase-bomba de cálcio dependente de ATP

CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência

COX - ciclooxigenase

CREB - proteína ligante de DNA responsiva ao AMPc

DAD - arranjo diferencial de diodos

DNA - ácido desoxirribonucléico

DPPH - α - α -difeníl- β -picrilhidrazil

EPM - erro padrão da média

EROs - espécies reativas de oxigênio

HCl - ácido clorídrico

IL-1 - interleucina-1

LTM - memória de longa duração

MAPK - proteína kinase ativada por mitógeno

OH•- - radical hidroxil

PKA - proteína Kinase A

PKC - proteína Kinase C

SNC - sistema nervoso central

STM –memória de curta duração

TNF- α - fator de necrose tumoral – alfa

UV - raios ultra-violeta

RNA - ácido ribonucléico

v.o-via oral

5-HT-5-hidroxitriptamina

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Figura 1. Compostos fenólicos	19
Figura 2. <i>Vaccinium ashei</i> Reade	27
Figura 3. Cromatograma de <i>Vaccinium ashei</i> Reade	28
Figura 4. <i>Rubus</i> sp. cultivar <i>Xavante</i>	30
Figura 5. Efeito da suplementação com mirtilo	188

Artigo 1

Tabela 1. Validation of precision of analytic method for Cyanidin from blueberries and blackberries	49
Tabela 2. Concentration of anthocyanidins in berries samples	50
Figura 1. Specificity validation for the HPLC analytical methods for cyanidin	51

Artigo 2

Tabela 1. Validation of precision of analytic method for rutin	61
Tabela 2. Individual flavonoids in blueberries and blackberries	62
Figura 1. Specificity validation for the HPLC analytical methods for rutin	63

Artigo 3

Tabela 1. Individual anthocyanins, flavonoids and poliphenols in blueberries	81
Figure 1. Radical scavenging activities of <i>Vaccinium ashei</i>	82
Figure 2. Teste de DPPH das frações de <i>Vaccinium ashei</i>	83
Figure 3. Effect of <i>Vaccinium ashei</i> on DNA damage in brain tissue.....	84

Artigo 4

Tabela 1. Effect of single treatment of <i>Vaccinium ashei</i> on the formalin test	105
Tabela 2. Effect of chronic treatment of <i>Vaccinium ashei</i> on the formalin test	106
Tabela 3. Effect of single treatment of <i>Vaccinium ashei</i> on the abdominal constrictions induced by acetic acid	107

Tabela 4. Effect of chronic treatment of <i>Vaccinium ashei</i> on the abdominal constrictions by acetic acid.....	108
Tabela 5. Antinociceptive effect of single treatment of <i>Vaccinium ashei</i> on hot-plate test.....	109
Tabela 6. Antinociceptive effect of chronic treatment of <i>Vaccinium ashei</i> on hot-plate test	110
Tabela 7. Antinociceptive effect of single treatment of <i>Vaccinium ashei</i> in tail-flick test	111
Tabela 8. Antinociceptive effect of chronic treatment of <i>Vaccinium ashei</i> in tail-flick test	112

Artigo 5

Tabela 1. Behavior of rats treated with <i>Vaccinium ashei</i> , in the open field test	126
Tabela 2. Behavior of rats treated with <i>Vaccinium ashei</i> , in the plus-maze test	126
Figura 1. Effect of <i>Vaccinium ashei</i> in a step-down inhibitory avoidance task	126
Figura 2. Effect of <i>Vaccinium ashei</i> on the radial maze	126

Artigo 6

Tabela 1. Effect of treatment of <i>Vaccinium ashei</i> in the open-field task	131
Tabela 2. Behavior of mice treated with <i>Vaccinium ashei</i> , in the plus-maze	132
Figura 1. Behavior of mice treated with <i>Vaccinium ashei</i> , in the inhibitory avoidance task	132
Figura 2. Effect of <i>Vaccinium ashei</i> on DNA damage in hippocampal tissue	132
Figura 3. Effect of <i>Vaccinium ashei</i> on DNA damage in cortex tissue	132

Artigo 7

Figura 1. Efeito do tratamento com <i>Vaccinium ashei</i> na tarefa de reconhecimento de objetos em ratos velhos	141
Figura 2. Efeito do tratamento com <i>Vaccinium ashei</i> na tarefa de reconhecimento de objetos em ratos adultos	141

Tabela 1. Efeito do tratamento com <i>Vaccinium ashei</i> na tarefa de <i>pluz maze</i> em ratos adultos	142
Figura 3. Efeito do tratamento com <i>Vaccinium ashei</i> na concentração de serotonina em hipocampo de ratos adultos	142
Figura 4. Efeito do tratamento com <i>Vaccinium ashei</i> na concentração de serotonina em corpo estriado de ratos adultos	143

Artigo 8

Tabela 1. Individual Anthocyanins, flavonoids and poliphenols in blackberries	167
Tabela 2. Chemotaxis inhibition of flavonoids fraction	168
Figura 1. Radical scavenging activities of <i>Rubus sp.</i> extract	169

Artigo 9

Figura 1. Effects of cyanidin chronic supplementation on lipid peroxidation in adult rat hippocampus	176
--	-----

RESUMO

Análise química e avaliação das atividades biológicas e comportamentais de extratos de frutas ricas em compostos fenólicos (Mirtilo e Amora-Preta)

O presente estudo teve como objetivos: determinar o teor dos polifenóis: flavonóides e antocianos totais presentes nos extratos de mirtilo (*Vaccinium ashei*) e amora preta (*Rubus sp*) por espectrofotometria; desenvolver e validar uma metodologia analítica para a caracterização dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), identificar, isolar e quantificar os principais compostos; avaliar a atividade anticolinesterásica, antioxidante frente à difenilpicrilhidrazol (DPPH) e anti-quimiotática *in vitro*; realizar a dosagem de aminas biogênicas no cérebro, investigar as possíveis atividades antinociceptiva, antiinflamatória, antiepiléptica, cognitiva e neuroprotetora do extrato de *Vaccinium ashei*, e o efeito neuroprotetor de um composto isolado a partir de *Rubus*: a cianidina, em vários modelos experimentais *in vivo*, em ratos e camundongos. Os perfis cromatográficos apresentaram compostos comuns às duas amostras; onde foram identificados 4 flavonóides, sendo hiperosídeo, quercitrina e isoquercitrina comuns a ambos extratos, e a rutina confirmada apenas em *Rubus*. Cinco antocianidinas foram identificadas em *Vaccinium*: delfinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina, e a cianidina em *Rubus*. Os resultados demonstraram, diferenças nas quantidades totais de polifenóis, flavonóides e antocianos. Todos os extratos, apresentaram atividade seqüestradora do radical DPPH *in vitro*. A atividade anti-quimiotática *in vitro* foi comprovada para a fração flavonoídica. Os ensaios biológicos realizados *in vivo* demonstraram que o extrato preparado a partir de uma mistura de diferentes cultivares de *Vaccinium ashei* apresentou efeitos antinociceptivos nos testes da formalina sub-plantar, contorções abdominais, placa quente e *tail flick*. Produziu também efeito neuroprotetor, avaliado pelo ensaio cometa e pelo método de TOSC. Também causou aumento da atividade locomotora, assim como exerceu um efeito ansiolítico em roedores adultos.

Facilitou a memória de curta duração e a Memória de longa duração e produziu um aumento de 5-HT no estriado e hipocampo de ratos adultos. Foi observado também que a cianidina isolada exerceu atividade neuroprotetora conforme avaliado pelo método de TOSC em ratos adultos. Não foram observadas diferenças significativas no modelo de epilepsia, entre o grupo tratado e o grupo controle, assim como não foram detectadas alterações no sistema dopaminérgico. Em síntese, os dados analisados em conjunto, permitem sugerir que o extrato de *Vaccinium ashei* e compostos isolados a partir de *Rubus* sp., como a cianidina, apresentam importante efeito neuroprotetivo, antinociceptivo e cognitivo, e nesta ação está envolvida a participação direta ou indireta dos receptores serotoninérgico, acetilcolinérgicos, opióides e de citocinas pró-inflamatórias. Neste sentido, foram obtidos avanços significativos acerca dos mecanismos de ação de ambos gêneros o que torna o seu extrato e seus princípios ativos interessantes para o aproveitamento e desenvolvimento de novos alimentos funcionais e/ou nutracêuticos.

Palavras-chave: *Vaccinium ashei*, *Rubus*, SNC, CLAE, validação, polifenóis, DPPH.

ABSTRACT

Chemical analysis and evaluation of the biological and behavioral activities of extracts of fruits rich in phenolic compounds (Blueberry and blackberry).

The objectives of this study were: comparing total phenolics, total anthocyanins and antioxidant capacity in appropriate berry samples from selected cultivars of the *Vaccinium ashei* and *Rubus*. A reliable HPLC procedure for determining the profile, quantifying and isolating of major compounds present in the extracts have been developed. The potential effects of the extracts were observed by chemotaxis assay, by acetylcholinesterase inhibition, and their antioxidant properties evaluated using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) *in vitro*. Otherwise, we examined the antinociceptive, antiinflammatory, cognitive, anti-epileptic and neuroprotective effects of the extract of *Vaccinium ashei* in several experimental models *in vivo*, as well as biogenic amine concentration, in specific brain regions in rats and mice. In addition, it was tested the efficacy of oral administration of cyanidin-3-glucoside extracted from *Rubus* sp. in lipid peroxidation in brain rats (TOSC). An HPLC method for the analysis of anthocyanidins and flavonoids in berries extracts have been developed. The data obtained show that various compounds are common in the fruits analyzed, and four flavonoids were identified: hyperoside, quercetin and isoquercitrin occurring in both fruits, and rutin occurring only in *Rubus*. Five anthocyanidins were identified in *Vaccinium*: delphinidin, cyanidin, peonidin, petunidin, and malvidin, and in *Rubus* cyanidin 3-glucoside was the major anthocyanin. We found that the flavonoids fractions significantly have inhibited migration cellular and acetylcholinesterase, and both total extract and fractions exhibited strong antioxidant activity. The extract (a mixture from the different cultivars) significantly enhanced short and long-term memory in the inhibitory avoidance task, induced an increase in the number of crossings during open field habituation, and had an anxiolytic effect in the elevated plus-maze task. These processes are accompanied by alterations in serotonin (5-

HT) in the striatum, and the hippocampus. Cyanidin 3-glucoside isolated significantly reduced lipid peroxidation in hippocampal tissue in rats. In conclusion, the data from the current study show that the *Vaccinium* extract produce an important neuroprotective, cognitive and antinociceptive effect, which could be related with a direct or indirect interaction with the serotonergic, cholinergic, opioids receptors and pro-inflammatory cytokines. On the other hand, the extract don't have protected the pentilenotetrazole-induced convulsions in mice, or influenced the memory retention in old rats when accessed in the step-down inhibitory avoidance, and showed no anxiolytic action in an elevated plus maze. The *Vaccinium ashei* extract did not alter locomotor activity, and the dopamine concentration in adult or old rats.

Keywords: *Vaccinium ashei*, *Rubus*, behaviour, CNS, HPLC, validation, poliphenols, DPPH.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Contextualização

O início do novo milênio apresenta numerosos desafios, entre os quais um novo cenário epidemiológico surgindo numa vertiginosa progressão em escala mundial. As enfermidades crônicas não-transmissíveis como obesidade, diabetes, enfermidades cardiovasculares e cerebrovasculares, câncer, osteoporose e outras afecções degenerativas apresentam hoje uma crescente atenção. Não apenas por seu impacto econômico como também pela redução na Qualidade de Vida e pelo comprometimento da saúde física e mental delas decorrentes (KWAK e JUKES, 2001a).

Dos 16 fatores de risco associados às principais causas de mortalidade reconhecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2003, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento, dez estavam relacionados com o estilo de vida entre estes a alimentação.

Alimentação adequada e padrão de atividade física regular constituem uma importante estratégia para o controle da morbi-mortalidade, bem como contribuem para que a vida das pessoas atinja seu potencial máximo. Entre outras dimensões, este potencial se traduz pela plena capacidade de crescimento e pelo desenvolvimento da mulher em idade fértil, resultando em novas gerações mais saudáveis na vida adulta, por sua capacidade de inserir-se produtivamente na sociedade, bem como em uma terceira idade ativa tanto física quanto mentalmente.

Outro desafio deste milênio se relaciona com o descobrimento ou redescobrimto de novos efeitos benéficos nos alimentos além de seu conhecido aporte nutricional, o que significa o desenvolvimento de investigações que demonstrem benefícios para a saúde, a partir de diferentes princípios ativos além dos nutrientes conhecidos dos alimentos. Estes benefícios se expressam como o aumento de uma função do organismo ou pela redução no risco de doença.

Em 1984, foram estudados no Japão alimentos que além de satisfazerem as necessidades nutricionais básicas desempenhavam efeitos fisiológicos benéficos. O interesse por esse tipo de alimentos se deu pelo aumento da expectativa de vida da população naquele país, por se buscar uma maneira de reduzir a incidência de doenças crônicas degenerativas e o custo representado por elas. Formou-se assim um programa de governo reunindo universidades japonesas e indústrias, com a finalidade de desenvolver alimentos saudáveis com propriedades medicinais (ARAI *et al.*, 2002).

Deste modo, o Japão foi o primeiro país a elaborar uma legislação alimentar para regular seu comércio e definir os alimentos funcionais como: *alimentos processados que contêm ingredientes que auxiliam em funções orgânicas específicas, além de serem nutritivos*. Eles reconheceram 12 classes de elementos ou ingredientes benéficos para a saúde, entre os quais se encontram as fibras, os oligossacarídeos, as vitaminas, bactérias lácticas, minerais, ácidos graxos poli-insaturados (ANJO, 2004). Em 1991, a categoria de alimentos foi regulamentada recebendo a denominação de "Foods for Specified Health Use" (FOSHU). A tradução da expressão realizada para o português é **Alimentos Funcionais ou Nutracêuticos**.

Nota-se que a expressão alimento funcional (AF), nutracêuticos, alimentos com alegações funcionais ou de saúde são os mais usados. A falta de diferenciação entre os termos "alimentos funcionais" e "nutracêuticos" justifica-se devido ao limitado conhecimento destes conceitos pela população. A informação contribui para uma maior aceitação dos alimentos funcionais, diferenciando-os dos nutracêuticos, os quais envolvem todos os tipos de alimentos que possuem algum efeito médico e de saúde (WALZEM, 2004).

O surgimento desses produtos que trazem um "algo mais", além dos nutrientes já conhecidos, teve influência de fatores como: o aumento da expectativa de vida da população, o aumento da consciência dos consumidores, que desejando melhorar a qualidade de suas vidas, optam por hábitos saudáveis. Esses consumidores criam uma demanda por produtos alimentícios que estão associados a efeitos benéficos e aos interesses econômicos da indústria de

alimentos, em razão dos altos custos com o tratamento de doenças e do avanço nos conhecimentos demonstrando uma relação entre a alimentação e o binômio saúde/doença (SOUZA *et al.*, 2003; ACNielsen).

Paralelamente, objetiva-se a redução do emprego de produtos sintéticos em alimentos industrializados, fortalecendo a asserção de que o alimento deve desempenhar funções terapêuticas e não trazer riscos à saúde. As frutas vermelhas são alimentos que atendem bem a alguns desses requisitos, já que apresentam numerosos compostos fenólicos, inclusive antocianos. Tais compostos possuem uma série de propriedades benéficas para a saúde humana, sendo algumas delas a capacidade analgésica, a atividade antiinflamatória e o efeito vasodilatador. Além disso, foi demonstrado que certas enzimas são alteradas pelos polifenóis como, por exemplo: as proteínas kinase C e ERK, ambas relacionadas com a modulação da memória (PATIL *et al.*, 2003; YOUDIM *et al.*, 2004).

Dentre estas frutas, o mirtilo e a amora-preta são excelentes exemplos. Na Região de Pelotas e no estado do RS estão sendo cultivadas estas plantas, ricas em antioxidantes, tradicionalmente utilizadas em outros continentes. Desse modo, a sua utilização como alimentos funcionais e/ou como fornecedoras de fitoquímicos com potencial preventivo e terapêutico é promissora, e poderá constituir uma mais-valia e uma fonte extra de rendimento para os agricultores que se dediquem ao cultivo destas espécies. Uma outra maneira de agregar valor a estas plantas seria desenvolver um processo de extração desses antioxidantes que pudesse ser utilizado por micro e pequenas empresas da região.

Nesse sentido, o presente trabalho objetivou realizar análises fitoquímicas visando identificar os compostos bioativos e estudar o mecanismo pelo qual extratos provenientes de frutos de *Vaccinium ashei* e *Rubus* sp. poderiam afetar diversas rotas neuronais de sinalização, que são importantes nos processos de aprendizagem e memória, nos processos normais e patológicos decorrentes do envelhecimento, e na terapêutica como agente antiinflamatório.

Visando um ordenamento dos assuntos abordados, o trabalho está dividido em 5 capítulos:

- O capítulo I apresenta uma revisão da literatura e desenvolvimento e validação do método por cromatografia líquida de alta eficiência, para a caracterização química e quantificação dos principais antocianos e flavonóides presentes nas amostras de mirtilo e amora-preta.

- O capítulo II relata os estudos de caracterização por espectrofotometria das diferentes cultivares de mirtilo e a atividade antioxidante frente à DPPH *in vitro*; bem como os efeitos neuroprotectivos *in vivo* da mesma amostra.

- O capítulo III aborda uma revisão bibliográfica sobre os mecanismos envolvidos na nocicepção, e relata os resultados obtidos após verificação da atividade antinociceptiva do extrato de mirtilo nos modelos de nocicepção química e mecânica.

- O capítulo IV apresenta uma revisão da literatura sobre conceitos básicos da memória e os efeitos da suplementação oral com extrato de mirtilo em diferentes modelos comportamentais em roedores.

- O capítulo V inclui um levantamento bibliográfico e o desenvolvimento de método para isolar cianidina-3glicosídeo e a administração oral deste composto para a investigação de propriedades biológicas no SNC.

1.2 Objetivos

Parte A. Análise química

- Avaliar os polifenóis: flavonóides e antocianos totais presentes nos extratos de mirtilo e amora-preta por espectrofotometria;
- Desenvolver e validar uma metodologia analítica para realizar a caracterização dos extratos por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), visando a identificação e quantificação dos principais compostos de mirtilo e amora-preta;
- Realizar o isolamento de cianidina-3-glicosídeo a partir da amora preta;
- Implementar a técnica de α - α -difênil- β -picrilhidrazila (DPPH) e posteriormente avaliar a atividade antioxidante frente à DPPH *in vitro* de forma quantitativa dos diferentes cultivares de mirtilo e amora-preta tanto do extrato total quanto das frações individuais;
- Realizar micro-isolamento das antocianinas, por CLAE, para a realização de ensaios biológicos de ambas as frutas previamente citadas;

Parte B: Avaliação das atividades biológicas:

- Determinar a atividade anticolinesterásica e avaliar a atividade antioxidante frente à DPPH em placa cromatográfica;
- Avaliar, a inibição da motilidade leucocitária, através do modelo de câmara de Boyden dos extratos de ambas as frutas acima mencionadas e das frações obtidas;

Ensaio realizado com extrato de mirtilo (*Vaccinium ashei*)

- Avaliar o efeito de extratos sobre a atividade pró-convulsivante produzida com pentilenotetrazol em camundongos;
- Investigar os efeitos antinociceptivos em camundongos;
- Avaliar o efeito sobre o aprendizado e memória em camundongos e ratos;
- Avaliar o efeito sobre a atividade locomotora, em camundongos e ratos;
- Avaliar o efeito ansiolítico em camundongos e ratos;
- Avaliar o efeito sobre os níveis dos neurotransmissores dopamina, serotonina e seus metabólitos em hipocampo, cortex e estriado de ratos;
- Realizar a determinação da capacidade antioxidante total (TOSC), no córtex e hipocampo de ratos tratados de forma crônica com extratos;
- Fazer a determinação do dano de DNA no córtex e no hipocampo de ratos e camundongos;

Ensaio *in vitro/vivo* realizado com extrato de amora-preta (*Rubus sp.*)

- Realizar o tratamento prolongado com cianidina-3-glicosídeo isolado, em ratos e realizar a determinação dos níveis de lipídios peroxidados (TBARS) em hipocampo, estriado, córtex pré-frontal, córtex cerebral de ratos;
- Correlacionar os dados moleculares obtidos com os efeitos biológicos obtidos nos modelos acima citados;

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Alimentos Funcionais

Embora ainda não exista um consenso mundial a respeito do que são os AF, a definição mais comum indica que um alimento pode ser considerado funcional se for demonstrado que pode influenciar positivamente uma ou mais funções alvo no corpo, além de possuir efeitos nutricionais adequados, de maneira a ser tanto relevante para o bem-estar e a saúde, quanto para a redução do risco de doença (ROBERFROID, 2002).

Os AF são alimentos* que provêm a oportunidade de combinar produtos comestíveis de alta flexibilidade com moléculas biologicamente ativas, como estratégia para consistentemente corrigir distúrbios metabólicos resultando em redução dos riscos de doenças e manutenção da saúde (ANJO,2004, WALZEM, 2004). Estes alimentos podem ser classificados, quanto à origem: vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem, atuando em diversos sistemas do organismo: no sistema gastrointestinal; no sistema cardiovascular; no metabolismo de substratos, no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular; e como antioxidantes (SOUZA, *et al.*, 2003). Podemos assumir que AF são todos os alimentos ou bebidas que, consumidos na alimentação cotidiana, podem trazer benefícios fisiológicos específicos, graças à presença de ingredientes fisiologicamente saudáveis (CÂNDIDO e CAMPOS, 2005).

Esta classe de alimentos pertence à nutrição e não à farmacologia, merecendo uma categoria própria, que não inclui suplementos alimentares; porém o seu papel em relação às doenças está, na maioria dos casos, concentrado mais na redução dos riscos do que na prevenção de doenças.

* Para o Codex Alimentarius, alimento é definido como sendo qualquer substância, quer seja processada, semi-processada ou crua, destinada ao consumo humano, incluindo bebidas, goma de mascar e qualquer substância que seja usada na fabricação, preparação ou tratamento do alimento. Porém, não inclui cosméticos, tabaco ou substâncias usadas apenas como drogas (SOUZA, *et al.*, 2003).

Os alimentos funcionais apresentam as seguintes características:

- devem ser alimentos convencionais a serem consumidos na dieta cotidiana;
- devem apresentar componentes naturais em concentrações adequadas, ou devem estar presentes em alimentos que normalmente não os supririam;
- devem ter efeitos benéficos além do valor nutritivo, que pode favorecer o bem-estar e a saúde e/ou reduzir o risco de ocorrência de doenças, promovendo benefícios à saúde além de aumentar a qualidade de vida, incluindo os desempenhos físico, psicológico e comportamental;
- a alegação da propriedade funcional deve ter embasamento científico;
- pode ser um alimento no qual um componente tenha sido removido, ou também onde a natureza de um ou mais componentes tenha sido modificada;
- pode ser um alimento no qual a bioatividade de componentes específicos tenha sido modificada (ROBERFROID, 2002).

2.2 Nutraceuticos

O nutraceutico, por sua vez, é um alimento ou parte de um alimento que proporciona benefícios para a saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento da doença. Sua ação varia desde o suprimento de minerais e vitaminas essenciais, até a proteção contra certas doenças infecciosas (HUNGENHOLTZ e SMID, 2002).

Estes produtos podem abranger nutrientes isolados, suplementos dietéticos, alimentos funcionais, produtos vegetais e alimentos processados tais como cereais, sopas e bebidas, e também podem ser produzidos através de métodos fermentativos com o uso de microrganismos (KWAK e JUKES, 2001a). Os nutraceuticos podem ser classificados como fibras dietéticas, ácidos graxos poliinsaturados, proteínas, peptídeos, aminoácidos ou cetoácidos, minerais, vitaminas e antioxidantes (ANDLAUER e FÜRST, 2002).

O seu alvo é diferente dos alimentos funcionais, por várias razões:

a) enquanto a prevenção e o tratamento de doenças (apelo médico) são relevantes aos nutracêuticos, apenas a redução do risco da doença, e não a prevenção e tratamento da doença estão envolvidos com os alimentos funcionais;

b) enquanto que os nutracêuticos incluem suplementos dietéticos e outros tipos de alimentos, os alimentos funcionais devem estar na forma de um alimento comum (KWAK e JUKES, 2001b).

Desta forma, no Brasil pode-se comparar a definição de substâncias bioativas com a de nutracêuticos. A resolução RDC 2 de 2002, define as substâncias bioativas como nutrientes ou não-nutrientes presentes em fontes alimentares que possuem ação fisiológica específica no organismo. Estas substâncias podem ser de origem natural ou sintética, desde que comprovada sua segurança para o seu consumo.

De acordo com Kruger e Mann (2003) os ingredientes funcionais são um grupo de compostos que apresentam propriedades benéficas à saúde, tais como as alicinas presentes no alho, os carotenóides e flavonóides encontrados em frutas e vegetais, os glucosinolatos encontrados nos vegetais crucíferos os ácidos graxos poliinsaturados presentes em óleos vegetais e óleo de peixe. Estes ingredientes podem ser consumidos diretamente através dos alimentos, sendo estes então considerados alimentos funcionais; ou individualmente, como nutracêuticos. Devem ter adequado perfil de segurança para o consumo humano, e não devem apresentar risco de toxicidade ou efeitos adversos com relação às drogas medicinais (BAGCHI *et al.*, 2004).

No entanto, a dificuldade se encontra na regulamentação destes termos, pois deve haver uma diferenciação entre produtos que são vendidos e consumidos como alimentos (funcionais), e aqueles em que um componente em particular foi isolado e é vendido na forma de barras, cápsulas, pós, entre outros (nutracêuticos) (COOPENS *et al.*, 2006).

Do ponto de vista legal, é sabido que os alimentos funcionais e nutracêuticos possuem conceituações semelhantes em muitas partes do mundo, persistindo a dificuldade de regulamentação dos termos. Deve ser mantida a diferenciação fundamental, que faz com que os alimentos funcionais se

relacionem à sua venda e consumo enquanto alimentos, ao passo que os nutracêuticos são ingredientes funcionais isolados e são consumidos sob diferentes formas, dadas pela indústria (SOUZA, *et al.*, 2003).

2.3 Conceito e Definição Legal

No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamentou os Alimentos Funcionais através das seguintes resoluções: ANVISA/MS 16/99; ANVISA/MS 17/99; ANVISA/MS 19/99. Segundo a ANVISA, alimentos funcionais *são aqueles que produzem efeitos metabólicos ou fisiológicos através da atuação de um nutriente ou não-nutriente no crescimento, desenvolvimento, manutenção e em outras funções normais do organismo humano*. Além disso, o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais, além de atuar em funções nutricionais básicas, irá desencadear efeitos benéficos à saúde e deverá ser também seguro para o consumo humano, sem supervisão médica.

As propriedades destes alimentos podem advir de seus constituintes normais como no caso das fibras, antioxidantes (vitamina E, C, betacaroteno) presentes em frutas, legumes, e cereais integrais, ou através da adição de ingredientes que modifiquem suas propriedades originais exemplificada por vários produtos industrializados, tais como: leite fermentado, biscoitos vitaminados, cereais ricos em fibras, etc. Também podem ser consideradas dentro deste grupo as modificações sobre a matriz do alimento que melhoram a biodisponibilidade de certos nutrientes ou suas condições de absorção (NEUMANN, *et al.*, 2002; TAIPINA, *et al.*, 2002).

Por sua vez, a comunidade europeia define um alimento como funcional *quando demonstra satisfatoriamente que afeta de forma benéfica uma ou mais funções do organismo além de seu aporte nutricional habitual, de uma maneira significativa tanto para incrementar o estado de saúde e/ou bem-estar ou para reduzir o risco de doença* (ASHWHEL, 2005).

No Reino Unido, o Ministério da Agricultura, Pesca e Alimentos (MAFF) define AF como *um alimento cujo componente incorporado oferece benefício fisiológico e não apenas nutricional*. Esta definição permite distinguir alimentos funcionais de alimentos fortificados com vitaminas e minerais.

Na Argentina ANMAT (administración nacional de medicamentos alimento e tecnología medica) considera que para que um alimento seja considerado funcional deve mostrar: a) que contribui para melhorar o estado de saúde e bem-estar por possuir um efeito benéfico sobre uma ou várias funções do organismo, além dos efeitos nutricionais conhecidos. b) que reduz o risco de doença. Entre os princípios ativos encontram-se vitaminas, minerais, fibras, fitoquímicos, probióticos e prebióticos.

Assim pode-se dizer que um alimento funcional pode resultar:

- 1) Da modificação de alguma condição em seu cultivo ou criação para modificá-lo favoravelmente (queijos, ômega3, antioxidantes).
- 2) A adição de um ingrediente ou princípio ativo que melhore a saúde ou a digestão do alimento (probióticos ou fitoesteróis em lácteos, antioxidantes em alimentos e bebidas).
- 3) A remoção de algum componente para diminuir potenciais efeitos adversos (fitatos por fermentação de vegetais para aumentar a biodisponibilidade de micronutrientes; remoção de determinados componentes da soja por extrusão, diminuição do conteúdo de colesterol do ovo).
- 4) Pela modificação da natureza de alguns dos nutrientes que compõe a matriz do alimento, como a hidrólise de uma proteína de fórmulas lácteas para diminuir seu potencial alérgico.
- 5) Modificação da estrutura e composição do alimento para melhorar a biodisponibilidade de um ou mais componentes (modificação da estrutura do amido para atingir uma absorção lenta da glicose e melhorar a sua provisão cerebral).

Já a Academia de Ciências dos EUA definiu os AF *como aqueles alimentos modificados ou que apresentem um ingrediente que demonstre uma ação que*

incremente o bem-estar do indivíduo ou reduza o risco de doença além da função tradicional dos nutrientes que possui.

Neste aspecto, a Associação Dietética Americana produziu um glossário com as definições básicas para alimentos funcionais (BLOCH e THOMSON, 1995):

Agente quimiopreventivo (Chemopreventive agent): alimento que apresente um nutriente ou composto do que foi cientificamente estudado como potencial inibidor da carcinogênese;

Alimento elaborado (Designer food): alimentos processados que são suplementados ou enriquecidos com compostos bioativos, naturalmente ricos em substâncias que previnem doenças. Isto envolve a engenharia genética ou de alimentos;

Alimento funcional (Functional food): todo alimento ou ingrediente modificado que proporciona efeitos benéficos além daquele fornecido por nutrientes comuns;

Farma-alimento (Pharma-food): alimento ou nutriente com potencial efeito benéfico ou uso médico, incluindo a prevenção e o tratamento das doenças;

Fitoquímicos (Phytochemical): substâncias encontradas em frutas e vegetais que podem ser ingeridas diariamente e que apresentam a propriedade de modular o metabolismo humano favorecendo a prevenção do câncer e de outras doenças;

Nutracêutico (Nutraceutic): substância considerada como alimento ou uma parte dele que proporciona efeitos benéficos ou médicos, incluindo a prevenção e o tratamento de doenças.

Nutracêutico é definido também como um produto alimentício consumido ou administrado enteralmente, sob a supervisão médica, baseada na avaliação médica para o manejo de uma determinada doença (HARDY, 2000; FERRARI e TORRES, 2003).

Deste modo, verificou-se que existem diferentes tipos de definições e usos para as alegações, sendo algumas vezes equivalentes entre os diferentes países, podendo, no entanto, apresentar diferenças significativas. Verifica-se também que todos os países em estudo compartilham alguns pontos comuns quanto aos critérios de avaliação, como: as alegações devem ser baseadas em estudos

científicos relevantes, e o produto deve ser seguro sem a necessidade de supervisão médica (PIMENTEL, *et al.*, 2005).

É importante salientar que antes do produto ser liberado para o consumo humano, deve obter registro no Ministério da Saúde e, para isso, precisa demonstrar sua eficácia e sua segurança de uso. O fabricante deve apresentar provas científicas: composição química ou caracterização molecular, quando for o caso, e ou formulação do produto; ensaios bioquímicos; ensaios nutricionais e ou fisiológicos e ou toxicológicos em animais de experimentação; estudos epidemiológicos; ensaios clínicos; evidências abrangentes da literatura científica. Reconhecimento por organismos internacionais de saúde e legislação internacionalmente reconhecidas sob propriedades e características do produto e comprovação de uso tradicional, observado na população, sem associação de danos à saúde (Brasil, 1999c; Brasil 1999d; PIMENTEL, *et al.*, 2005). Lembrando ainda que as alegações possam fazer referências à manutenção geral da saúde, à redução de risco, mas não à cura de doenças (tabela 1).

Tabela 1. Comparando o alimento funcional com o medicamento:

Alimentos	Medicamentos
Nutrição e energia necessária para a vida	Tratamento de uma doença
Benefício através do uso prolongado	Efeito imediato
Para toda uma população	Para uma população específica
Seguro	Benefício/risco
Consumidor escolhe ou também por Prescrição médica ou de profissional de saúde	Prescrição médica ou de profissional de saúde

Fonte: adaptado a partir de YETLEY, 1996.

Portanto, os alimentos funcionais representam um conceito, mais do que um grupo definido de alimentos, e sua área é precisamente a dos alimentos, ou seja, eles possuem valor nutricional, aspecto, propriedades sensoriais e demais atributos de todo alimento. Não são um veículo de drogas com ação farmacológica, porém representam uma conjugação com princípios ativos, que quando consumidos em uma quantidade razoável exercem ações benéficas no nível fisiológico (NOONAN e NOONAN, 2004).

2.4 Alimentos funcionais e seus componentes bioativos

A maior parte dos AF encontra-se nos alimentos de origem vegetal, pela presença de fitoquímicos, assim com em produtos de origem animal reconhecidos por suas propriedades benéficas. A seguir está apresentada uma lista dos alimentos mais estudados e seus supostos benefícios à saúde.

Aveia: a aveia por ser fonte de fibras solúveis beta glucana, foi o produto que recebeu a primeira alegação de saúde aprovada pela FDA. Os benefícios incluem: efeitos protetores contra doenças cardiovasculares, hipertensão e o bom funcionamento intestinal (KUSHI *et al.*, 1999).

Alho: Estudos epidemiológicos indicam que esse alimento pode reduzir o risco de doenças coronárias e alguns tipos de câncer, propriedade vinculada com a presença de alicina (HASLER, 2001).

Tomate: Trabalhos demonstraram que existia uma relação inversa entre o consumo de tomate e os produtos a base de tomate e a redução do risco de câncer (por ex. câncer de próstata, pulmão e esôfago), propriedade vinculada com a presença de licopenio (SHAMI e MOREIRA, 2004).

Soja: As isoflavonas, fitoestrogenos presentes em grandes quantidades na soja estão sendo relacionados à redução do risco de câncer de mama, osteoporose e redução de efeitos da menopausa (MUNRO, 2003).

Linhaça: Possui propriedades antiinflamatórias e antialérgicas. O consumo de linhaça também parece diminuir os níveis de colesterol e de LDL sendo portanto vinculada com a redução dos riscos de doenças cardiovasculares (HASLER,2001).

Frutas cítricas: Flavonóides e limonóides são os dois principais compostos responsáveis pelas atividades farmacológicas destas frutas vinculadas principalmente com a redução do risco de câncer em humanos (HASLER, 1998).

Vinho tinto e uvas: As pesquisas indicando uma relação entre a ingestão de vinho e a redução de doenças cardiovasculares, datam de 1979. Atualmente as pesquisas relacionam seus efeitos benéficos com a presença de polifenóis incluíno o resveratrol (componentes não alcoólicos do vinho) (JANG, 1997).

Peixe: A *American Heart Association* recomenda o consumo de uma ou duas porções de peixe por semana devida a presença de ácidos graxos omega-3 e sua relação com a redução do risco de hipertensão e câncer (SIMOPOULOS, 1999).

Prebióticos: São definidos como alimentos não hidrolisáveis no trato gastrointestinal superior, que promovem o crescimento preferencial de bactérias intestinais, particularmente Bífidobacterias e os Lactobacilus. São classificados do ponto de vista nutricional, como fibras dietéticas e são constituídos de carboidratos pouco absorvidos no trato gastrointestinal superior como, por exemplo, a oligofrutose. Estão habitualmente presentes nas frutas e vegetais tais como trigo, banana, cebola, tomate etc (BLAUT, 2002).

Probióticos: São definidos como preparações e produtos contendo microorganismos viáveis, bem definidos e em quantidades suficiente para alterar a microbiota intestinal, exercendo efeitos saudáveis no organismo. Os probióticos mais utilizados envolvem os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (SAAD, 2006).

2.5 Histórico

Numerosos fatores afetam a Qualidade de Vida, de forma que a população deve conscientizar-se da importância de alimentos contendo compostos biotativos que auxiliam a promoção da saúde. A incidência de morte devido a doenças como câncer, acidente vascular cerebral, arteriosclerose, enfermidades hepáticas, dentre outros, pode ser minimizada através de hábitos alimentares apropriados.

Em contrapartida, uma alimentação inadequada pode comprometer a saúde. Nos EUA, por exemplo, segundo dados do Departamento de Saúde e Serviços Humanos, a dieta foi associada a 5 das 10 principais causas de morte: (entre elas as doenças coronárias, câncer, diabetes). O padrão alimentar responsável por tantas mortes, compreende por um lado grandes quantidades de gordura total, de gordura saturada, colesterol, sódio e açúcar refinado, e por outro lado pequenas quantidades de frutas e verduras (HASLER, 2001).

No Brasil, o consumo de alimentos considerados benéficos para a saúde, como as frutas, vem diminuindo gradativamente por conta do crescimento da indústria alimentícia e do estilo de vida inadequado de muitas pessoas, que dão ênfase em suas dietas a produtos processados, na maioria das vezes com alto valor calórico e baixo valor nutricional. Observam-se no país tendências nutricionais desfavoráveis como o excessivo consumo de gorduras, de açúcar e sal, em detrimento ao consumo de frutas, vegetais e grãos integrais, ricos em compostos bioativos com ação antioxidante.

Nos últimos anos as classes sociais denominadas D e E tiveram um incremento na qualidade de vida e passaram a consumir maior quantidade de alimentos industrializados ricos em gorduras e baixa qualidade nutricional, tendo

como uma das consequência o aumento da freqüência de crianças obesas, antes não comum nestas classes sociais (POF 2002-2003).

A mudança no padrão alimentar tem gerado um processo denominado de transição epidemiológica, ou seja, está ocorrendo uma significativa redução nas doenças infecciosas e um grande aumento nas chamadas enfermidades crônico-degenerativas. Neste sentido, as doenças cardiovasculares ocupam o primeiro lugar como "causa mortis", e outras enfermidades como o câncer, diabetes e as doenças de fundo neurológico como Alzheimer e Parkinson, encontram-se entre as dez primeiras causas de mortalidade (ABREU, 2003). Desta forma, os recursos financeiros do país são insuficientes para promover a saúde da população, principalmente daqueles com idade superior a 50 anos (ABREU, 2003).

Por outro lado, a baixa incidência destas doenças em outras populações chamou a atenção para a sua dieta; os esquimós, com sua alimentação baseada em produtos do mar ricos em ácidos graxos poliinsaturados das famílias ômega 3 e 6, têm baixo índice de problemas cardíacos (PIMENTEL *et al.*, 2005), assim como os franceses, devido ao consumo de vinho tinto, o qual apresenta grande quantidade de compostos fenólicos (BENAVENTE-GARCÍA *et al.*, 1999). Os orientais, por sua vez, devido ao consumo de soja, a qual contém fitoestrogênios (isoflavonóides), apresentam baixa incidência de câncer de mama (ANJO, 2004).

Estudos epidemiológicos realizados com humanos e com animais estabeleceram uma relação entre o consumo de frutas e vegetais com reduzido risco de câncer (estômago, esôfago, pulmão, cavidades orais e faringe, endométrio, pâncreas, cólon e próstata) (BLOCH e THOMSON, 1995). Os tipos de frutas e vegetais que mais freqüentemente aparecem como protetores nesses estudos são o tomate, a soja, o alho e a cebola, as frutas cítricas como o limão, laranja e tangerina, vegetais crucíferos como brócolis, couve-flor, repolho e couve de Bruxelas, e frutas vermelhas como a uva, a framboesa e o morango (CANTUTI-CASTELVETRI *et al.*, 2000). Contudo, esses estudos epidemiológicos são realizados com base numa determinada prática dietética (rica em alimentos funcionais) e não em relação aos componentes individuais destas dietas.

2.6 Antioxidantes Naturais: Compostos fenólicos

Durante a década passada, o termo funcional quando aplicado aos alimentos foi adotado com uma conotação diferente que foi a de proporcionar um benefício fisiológico adicional além de apenas satisfazer as necessidades nutricionais básicas. Ainda que uma profusão de compostos biologicamente ativos tenha sido identificada, faltam trabalhos que aprofundem os detalhes técnicos acerca da forma de ação dos compostos específicos presentes em vários alimentos.

Nesse contexto, polifenóis estão sendo extensivamente estudados, procurando-se estabelecer sua eficiência de absorção no trato gastrointestinal, biodisponibilidade, mecanismos de ação e recomendações para consumo humano. Estes compostos são os antioxidantes mais abundantes da dieta, e o consumo diário pode atingir 1 g, o que é muito maior que o consumo de todos os outros fitoquímicos com propriedades benéficas. Inicialmente acreditava-se que a absorção destes compostos era insignificante (por volta de 1-25%). Contudo, estudos recentes demonstraram até 50% de absorção de alguns polifenóis (flavonóides, inclusive antocianos) (ROSS e KASUM, 2002; PASSAMONTI *et al.*, 2003).

Os compostos fenólicos enquadram-se em diversas categorias (figura 1), como ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), flavonóides (flavonols, flavonas, flavanas, flavanonas, isoflavonóides), e estilbenos (resveratrol) (PETERSON e DWYER, 1998; RIBEIRO e SERAVALLI, 2004). Entre estes compostos, os mais estudados são os flavonóides, que têm em comum a estrutura C6-C3-C6, consistindo de dois anéis aromáticos ligados por um heterocíclico oxigenado. Dentre os aproximados 4000 flavonóides já descritos, as maiores classes são flavonóis, catequinas ou flavonas, antocianidinas e isoflavonas. Nestas classes há grandes variações estruturais, dependendo do nível de hidrogenação, hidroxilação, metilação e sulfonação das moléculas. Além disso, flavonóides formam complexos com açúcar, lipídios, aminas e ácidos carboxílicos (LOPES *et al.*, 2000).

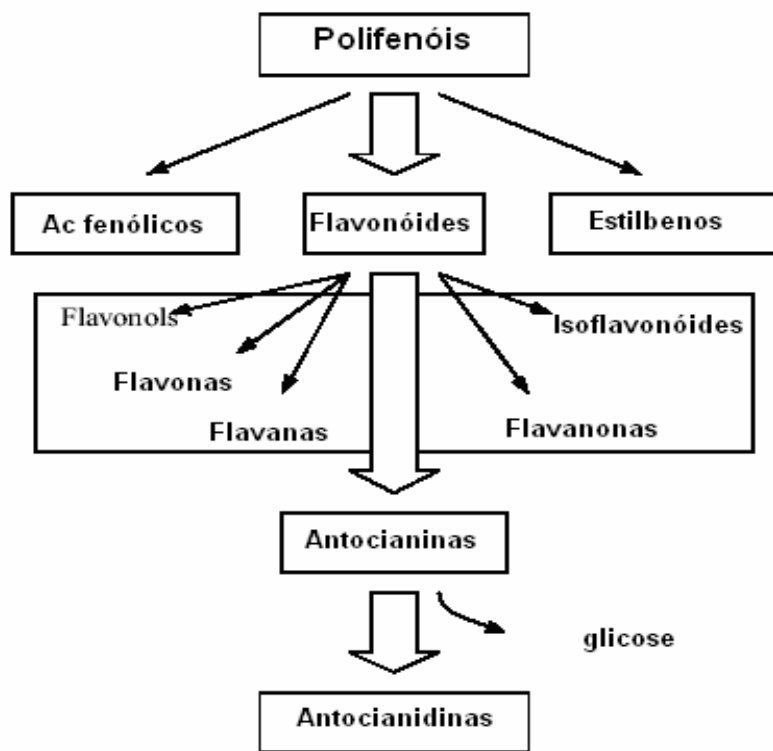


Figura 1. Compostos fenólicos.

Fonte: adaptado a partir de RIBEIRO e SERAVALLI, 2004.

Os efeitos bioquímicos dos polifenóis podem ser divididos em quatro categorias: (1) ligação por afinidade a polímeros biológicos; (2) ligação a íons de metais pesados; (3) catálise de transporte de elétrons e (4) habilidade de seqüestrarem radicais livres (HAVSTEEN, 1983, 2002; RUSSO e BROSE 2002). Embora numerosos estudos indiquem a eficácia de polifenóis como antioxidantes, e a possível relação entre estas substâncias e a redução de oxidações envolvidas em determinadas doenças, resultados favoráveis são obtidos em concentrações que variam de $< 0,1$ a $> 100 \mu\text{mol/L}$. Os níveis fisiológicos geralmente encontram-se em torno de $1 \mu\text{mol/L}$; desta forma, nem todos os polifenóis ingeridos serão antioxidantes (ROSS e KASUM, 2002). Apesar de todos os benefícios

provenientes da capacidade antioxidante* dos polifenóis, ressalta-se seu papel como quelantes de nutrientes, como o ferro, o cálcio, aminoácidos e proteínas no trato gastrointestinal.

Por isso, foram denominados compostos anti-nutricionais durante muito tempo, e seu consumo elevado (por suplementação) pode estar associado à redução da biodisponibilidade de determinados nutrientes essenciais (ROSS e KASUM, 2002). A biodisponibilidade de polifenóis é variável e influenciada por diversos fatores como transporte, biotransformação e excreção, que continuam pouco compreendidos; assim, mais estudos serão necessários para o estabelecimento de recomendações dietéticas mais específicas (YOUDIM *et al.*, 2003, 2004).

2.6.1 Compostos fenólicos na dieta

O estresse oxidativo, agudo e crônico, tem sido relacionado à um grande número de doenças degenerativas, como aterosclerose, diabetes, injúria isquêmica, doenças inflamatórias (artrite reumatóide, pancreatite), câncer, doenças neurológicas (doença de Parkinson, esclerose lateral amiotrófica, doença de Alzheimer), hipertensão, doenças oculares (degeneração macular relacionada ao envelhecimento), doenças pulmonares (doença pulmonar obstrutiva crônica).

Além disso, os efeitos crônicos de espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS) são considerados agentes importantes no processo de envelhecimento (BONDY, 1995; MILLS *et al.*, 2003). Considerando-se que a produção de ROS/RNS e as defesas antioxidantes estejam em ajuste contínuo, pode-se supor que em algumas situações o balanço pode tender facilmente em favor das espécies reativas. Além disso, a própria natureza reativa destas espécies provoca modificações em biomoléculas, gerando alterações em suas estruturas e funções.

* Halliwell e Gutteridge (1999) definiram antioxidante como alguma substância presente em concentrações baixas, comparadas às concentrações do substrato oxidante, que previne significativamente ou atrasa a oxidação de substratos susceptíveis

Entre as mais drásticas, encontram-se alterações na ribose e bases nitrogenadas do DNA (ácido desoxirribonucléico); ligações cruzadas entre bases nitrogenadas, DNA e proteínas e proteína- proteína; formação de adutos; peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados (PUFAs) que compõem membranas plasmáticas e lipoproteínas, e nitração e nitrosilação de proteínas (LINARES *et al.*, 2001; MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2005).

O estresse oxidativo poderia ocorrer em várias situações patológicas ou ambientais que aumentem a produção de ROS/RNS, e em conseqüência do consumo inadequado de antioxidantes provenientes da dieta. Por outro lado, não existem evidências de que o consumo de alimentos ricos em antioxidantes ao longo da vida acarrete efeitos prejudiciais. Ao contrário, há significativas evidências epidemiológicas de que estão associados a um envelhecimento saudável e à longevidade funcional (ex. dieta mediterrânea) (RICE-EVANS *et al.*, 1997).

A extração e a purificação de antioxidantes a partir de fontes naturais têm se tornado essencial para a utilização dessas substâncias na preparação de alimentos funcionais, e como aditivos para produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios, com o objetivo de substituir os antioxidantes sintéticos uma vez que aumentam a vida útil de muitos produtos em 15 a 200%. Tal efeito decorre de suas propriedades, que retardam reações de oxidação em alimentos, e há perspectivas de que antioxidantes dietéticos possam ser usados futuramente no tratamento de doenças cuja gênese envolva processos oxidativos (LOPES *et al.*, 2000).

Vários efeitos biológicos benéficos têm sido atribuídos aos polifenóis, visto que são capazes, por exemplo, de inibir a peroxidação de lipídeos, a exsudação de proteínas, a migração de leucócitos, e de ativar sistemas de enzimas, incluindo ciclooxygenases e lipoxigenases (PASSAMONTI *et al.*, 2003). Sabe-se que a peroxidação lipídica está intimamente relacionada com processos inflamatórios. A atividade antiinflamatória/antioxidante de polifenóis isolados como as antocianinas (cianidina, pelargonidina) foi testada por Tsuda e colaboradores (2002).

Os resultados sugerem que esses compostos podem exercer importante papel na peroxidação de membranas celulares, induzidas por radicais de oxigênio, ativos em sistemas vivos (AMOROS *et al.*, 1992), e que, além disso, o consumo de antocianos tem demonstrado ação farmacológica em modelos animais de artrites e gotas. Estudos têm mostrado que a flavanona naringina e sua forma glicosilada naringina, quando associada a corantes alimentícios como as antocianinas, está relacionada com uma acentuada redução da hiperlipidemia induzida (LOPES *et al.*, 2000).

Com isso, é de grande importância o estudo dos efeitos nutricionais e farmacológicos de compostos naturais, como polifenóis, visando propiciar alternativas para a prevenção daquelas patologias, uma vez que várias pesquisas têm demonstrado que tais compostos apresentam atividade antiinflamatória através da inibição das enzimas envolvidas na síntese de prostaglandinas e leucotrienos, potentes mediadores da resposta inflamatória (ANJO, 2004).

2.7 Frutas vermelhas na dieta

2.7.1. Estudos promissores de avaliação cognitiva

Existem vários estudos epidemiológicos que avaliaram o potencial das frutas como alimentos funcionais; dentre estes, as uvas são consideradas uma das maiores fontes de compostos fenólicos quando comparadas à outras frutas e vegetais. Diversos efeitos benéficos à saúde têm sido atribuídos a estas frutas em função de estudos epidemiológicos que mostram correlação inversa entre o consumo moderado de vinho e a incidência de doenças cardiovasculares. Estes estudos tiveram início a partir de investigações relacionadas à dieta francesa, que apesar de rica em gorduras de origem animal, parece associada à baixa incidência de doenças cardiovasculares, fenômeno conhecido como "Paradoxo Francês" (BENAVENTE-GARCÍA *et al.*, 1999).

Com relação ao Sistema Nervoso, numerosos estudos comportamentais têm sido utilizados para examinar os efeitos de extratos obtidos a partir de plantas medicinais e de frutas neste sistema. Uma pesquisa recente (SHUKITT-HALE *et*

al., 2008), avaliou o efeito do suco de uva no comportamento e na função neuronal de ratos adultos. Os ratos foram distribuídos aleatoriamente, em três grupos de estudo: o grupo controle bebeu somente água; um grupo tratado consumiu 10% de suco de uva, e um grupo tratado recebeu 50% de suco de uva; a dieta foi equivalente para os três grupos.

Após seis semanas os ratos foram testados para avaliar as habilidades motoras, e depois de oito semanas, vários testes cognitivos foram realizados. Em termos de performance cognitiva, os pesquisadores observaram que o grupo de 10% de suco teve performance superior ao grupo de 50% de suco.

Estes achados sugerem que doses altas de suco de uva aumentam a performance motora, enquanto que doses mais baixas são suficientes para alterar a performance cognitiva. Os pesquisadores sugerem que os efeitos do suco de uva podem ser resultantes de uma mistura de polifenóis. O suco da fruta, com um grande número de polifenóis distintos, pode ser mais eficaz do que qualquer componente isolado.

Os mesmos autores (JOSEPH *et al.*, 1998), em um estudo previo, demonstraram que a administração prolongada de extrato de *strawberry*, bem como de espinafre, protegem os animais de forma significativa do estresse oxidativo crônico induzido pela idade, e sugerem que essa redução do estresse seria manifestada em melhoras cognitivas e comportamentais.

Através de experimentos subseqüentes realizados pelos mesmos autores (JOSEPH *et al.*, 1999), foi demonstrado que a administração por 8 semanas de mirtilo promove uma melhoria da atividade locomotora (equilíbrio e coordenação) em ratos velhos. O mais interessante desta pesquisa é que nenhum dos outros grupos tratados (*strawberry*, espinafre) apresentaram diferenças nesta tarefa com relação ao grupo controle. Além dos efeitos antioxidantes, acredita-se que o aumento de atividade locomotora pode estar relacionado, pelo menos em parte, a uma modulação direta ou indireta sobre as rotas de sinalização celular, decorrente dos antocianos presentes no mirtilo.

Dentro deste contexto, os autores também reportaram que a suplementação com mirtilo (rico em antocianos) exerce efeitos sobre a atividade

dos receptores muscarínicos-colinérgicos. Além disso, está vinculada a canais iônicos ligante-dependente via ativação do adenosinamonomofosfato cíclico (AMPc), e das proteinocinases A (PKA) e C (PKC), proteinocinases ativadas por mitógenos (MAPK), e a transcrição gênica, bem como na síntese de novas proteínas, responsáveis por alterações fenotípicas que contribuirão para amplificação da resposta à suplementação (JOSEPH *et al.*, 2005; DUFFY *et al.*, 2007).

Numerosos estudos *in vitro/in vivo* indicam que após administração oral, antocianos são absorvidos e atravessam a barreira hematoencefálica após aproximadamente 23 horas de suplementação, e podem efetivamente exercer efeitos sobre o sistema nervoso central (PASAMONTI *et al.*, 2003; YOUDIM *et al.*, 2003, 2004).

Neste contexto, estudos por cromatografias líquida, acoplada a espectrometria de massa (LC-MS/MS), revelam a presença de antocianos em diversas estruturas cerebrais (córtex, cerebelo e estriado) de animais tratados com o extrato de mirtilo, o que sugere a existência de uma relação entre o número de diferentes antocianinas presentes nessas regiões cerebrais (não suas quantidades totais), com os resultados obtidos nas tarefas comportamentais estudadas (ANDRÉS-LACUEVA *et al.*, 2005).

2.7.2 Dieta deficiente em antioxidantes: Grupos vulneráveis

2.7.2.1 Idosos

Como previamente mencionado, o dano oxidativo de biomoléculas pode levar à inativação enzimática, mutação, ruptura de membrana, aumento na aterogenicidade de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade, e à morte celular. Estes efeitos tóxicos do oxigênio têm sido associados ao envelhecimento e ao desenvolvimento de doenças crônicas, inflamatórias e degenerativas (JOSEPH *et al.*, 2005; SHUKITT-HALE *et al.*, 2008).

Há perspectivas que reportam que antioxidantes dietéticos possam ser usados futuramente no tratamento de doenças cuja gênese envolva processos oxidativos. Entretanto, publicações recentes sugerem que os antioxidantes são

eficazes na prevenção de doenças crônicas associadas ao estresse oxidativo, quando administrados a grupos que apresentem concentrações plasmáticas inadequadas destes micronutrientes (JOSEPH *et al.*, 1998, 2003, 2005; SHUKITT-HALE *et al.*, 2008).

Os idosos constituem um grupo vulnerável à desnutrição, devido por exemplo, à perda funcional da capacidade do pâncreas e intestino delgado, o que compromete a digestão e absorção de nutrientes. Associa-se ainda o declínio da função renal, que acarreta uma maior excreção de micronutrientes, somado a um menor consumo alimentar devido ao decréscimo na sensibilidade dos sentidos, como paladar e olfato. Paralelamente ao aumento da expectativa de vida, há o aumento de doenças crônico-degenerativas não transmissíveis que, entre outros fatores, pode também resultar do decréscimo das defesas antioxidantes, decorrente de uma dieta inadequada (SHUKITT-HALE *et al.*, 2008).

Desta forma, o estudo das necessidades dietéticas reais dos idosos bem como o desenvolvimento de alimentos funcionais no qual a bioatividade de um ou mais componentes tenha sido modificada, por exemplo, para o aumento da disponibilidade e absorção de um determinado composto, são relevantes. Nessa perspectiva, devem-se estabelecer as verdadeiras necessidades destes indivíduos, verificar se o planejamento alimentar é capaz de suprir estas necessidades e, caso não o seja, estabelecer doses seguras de suplementos alimentares (HIGDON e FREI, 2003).

No entanto, estudos recentes de suplementação com extratos polifenólicos ricos em antocianos, inclusive o mirtilo, revelam que o extrato reduz o declínio da capacidade cognitiva e melhora a atividade locomotora em ratos velhos após administração prolongada. Entre estes processos, o mais evidente é a capacidade antioxidante destes compostos atribuída ao poder redutor do grupo hidroxila aromático, que reduz os radicais livres reativos e produz o radical fenoxila, estabilizado por ressonância (JOSEPH *et al.*, 2003, 2005; SHUKITT-HALE *et al.*, 2006, 2008).

Os componentes celulares não são protegidos totalmente por antioxidantes endógenos, e está bem estabelecido que os antioxidantes obtidos da dieta são

indispensáveis para a defesa apropriada contra oxidação e, portanto, apresentam importante papel na manutenção da saúde. Levando-se em consideração que muitos idosos sofrem comprometimento de sua capacidade cognitiva, esse resultado pode conduzir a práticas de considerável impacto na saúde pública.

2.7.2.2 Doença de Alzheimer (DA): Uma abordagem nutricional.

Entre os transtornos cognitivos mais graves está a DA, e uma das hipóteses plausíveis é que a DA seja causada pela disfunção do sistema colinérgico central, o que justifica o uso de drogas que inibem a degradação da acetilcolina. O efeito desses medicamentos é retardar, até certo ponto, o avanço da doença, e é com base nessa hipótese que se defende o emprego de alimentos funcionais ou componentes alimentares fisiologicamente ativos, também designados bioativos.

Alguns trabalhos experimentais têm demonstrado que a administração de flavonóides como apigenina-7-glucosídeo e quercetina em um modelo animal para DA (utilizando esQUIVA passiva e a tarefa de labirinto em cruz elevado) reverte deficiências cognitivas relacionadas com a idade, por meio da modulação de certas moléculas como a interleucina 6, vinculada com a progressão de desordens neurodegenerativas, inclusive DA (PATIL *et al.*, 2003).

Um estudo adicional realizado por JOSEPH e colaboradores (2003), utilizando um modelo animal para DA (camundongos transgênicos, utilizando a tarefa de Y-maze) descreve os efeitos positivos da suplementação prolongada com mirtilo neste modelo. Este estudo demonstrou que existem diferenças na disposição das placas amilóides no cérebro de animais tratados com o extrato em relação ao grupo controle, e alterações na expressão das proteínas kinase C e ERK, ambas relacionadas com a modulação da memória (JOSEPH *et al.*, 2005; McGUIRE *et al.*, 2006). Os resultados com animais são promissores, mas as evidências clínicas sobre a eficiência desse tipo de tratamento ainda são incipientes e requerem maior aprofundamento.

3 MIRTILO (*Vaccinium ashei* Reade)

As frutas do gênero *Vaccinium* podem ser consideradas como os primeiros alimentos funcionais. A população emprega as plantas há centenas de anos para muitos propósitos medicinais como o tratamento de transtornos urinários, prevenção do escorbuto, uso tópico em ferimentos, onde também se destacam as atividades antibacteriana e diarréica (BEATTIE *et al.*, 2005).

O mirtilo é membro da família *Ericaceae*, subfamília *Vaccinoideae* e gênero *Vaccinium* (Eck, 1966); é nativo da América do Norte (Estados Unidos e Canadá), onde é conhecida popularmente como “blueberry”. Esta fruta foi domesticada inteiramente no século XIX, desenvolveu um mercado mundial (GALLETTA, 1975) apresentando-se a maior parte das vezes na forma de arbustos.

Galletta e Ballington (1996) classificam os mirtilo cultivados comercialmente em cinco grupos principais: *Highbush*, *Half high*, *Southern highbush*, *Rabbiteye*, *Lowbush*. O grupo chamado *Vaccinium ashei* Reade ou “rabbiteye” (olho de coelho), é a espécie considerada pelos melhoristas como aquela que oferece as maiores possibilidades de melhoramento porque é tolerante a uma variação maior de pH do solo e a altas temperaturas, tem certa resistência à seca e baixa necessidade de clima frio (figura 2).



Figura 2: *Vaccinium ashei* Reade. Fonte: EMBRAPA

Os membros de *Vaccinium ashei* Reade são conhecidos por conter uma grande diversidade de compostos químicos, muitos dos quais exibem significante

atividade biológica. Investigações fitoquímicas (NAKAJIMA *et al.*, 2004), revelaram vários compostos polifenólicos incluindo 15 antocianos (figura 3) que correspondem a: delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina (galactosídeo, glucosídeo e arabinose). Do mesmo modo foram identificados certos ácidos fenólicos, como catequinas, proantocianidinas, glicosídeos, flavonóides glicosilados e estilbenos (PRIOR *et al.*, 1998; SELLAPPAN *et al.*, 2002).

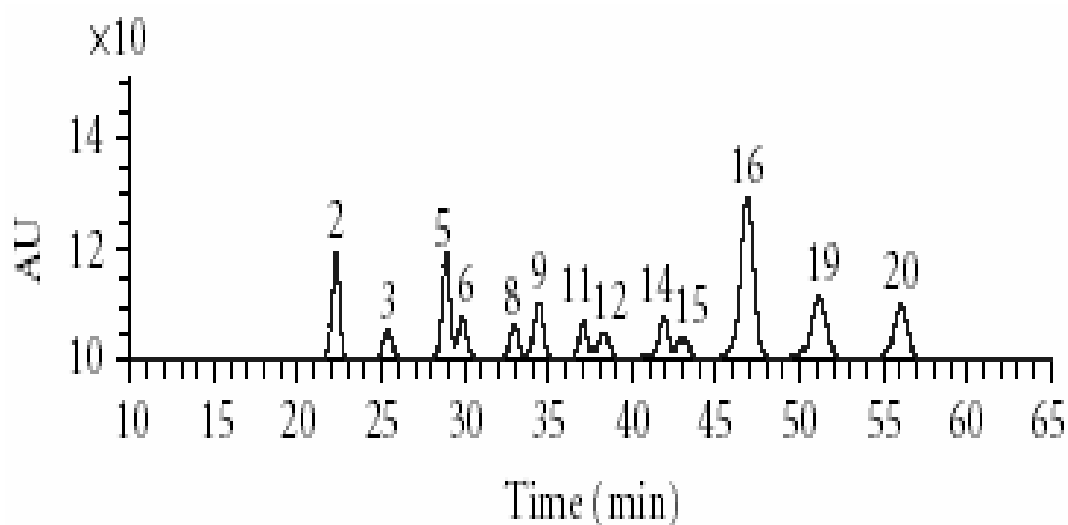


Figura 3. Cromatograma correspondente ao perfil de antocianos do extrato de *Vaccinium ashei* Reade obtido por LC/PDA/ESI-MS. 2:delphinidina-3-galactosídeo; 3:delphinidina-3-glucosídeo; 5:cianidina-3-galatosídeo; 6:delphinidina-3-arabinose; 8:cianidina-3-glucosídeo; 9:petunidina-3-galactosídeo; 11:cianidina-3-arabinose; 12:petunidina-3-glucosídeo; 14:peonidina-3-galactosídeo; 15:petunidina-3-arabinose; 16:a)peonidina-3-glucosídeo, b)malvidina-3-galactosídeo; 19:a)peonidina-3-arabinose, b)malvidina-3-glucosídeo; 20:malvidina-3-arabinose. Fonte: Nakajima *et al.*, 2004.

Como anteriormente mencionado, estudos recentes mostraram que a administração oral do extrato de *Vaccinium* apresentou importante atividade

neuroprotetora e antiinflamatória, e estudos posteriores mostraram a afinidade do extrato por receptores muscarínicos-colinérgicos (JOSEPH *et al.*, 2005). Sabe-se que a peroxidação lipídica está relacionada com processos inflamatórios.

A atividade antioxidante das antocianinas isoladas cianidina-3-glicosil-cianidina e cianidina foram testadas por Tsuda e colaboradores (1994), que utilizaram auto-oxidação do ácido linoléico, lipossomos, membranas de eritrócitos de coelho e sistemas microssomais de fígado de roedores (KOWALCZYK *et al.*, 2003).

Antocianos em geral, apresentam atividade antioxidante em todos os sistemas estudados. Os dados sugerem que esses compostos podem exercer importante papel na peroxidação de membranas celulares, induzidas por radicais de oxigênio, que se encontram ativos em sistemas vivos (GUTTERIDGE, 1995).

Adicionalmente, foi observado que esses compostos inibem a atividade da lipoxigenase, ciclooxigenase e apresentam atividade anticancerígena (WANG *et al.*, 1999, 2000; WANG e MAZZA, 2002).

4 AMORA-PRETA (*Rubus* sp.)

A amora-preta (figura 4) pertence ao gênero *Rubus* (flia. Rosaceae), contém aproximadamente 740 espécies, divididas segundo alguns autores em 12 subgêneros, ou segundo outros em 15 subgêneros (JENNINGS, 1995, DAUBENY *et al.*, 1996). O cultivo de amoras se tornou popular nos Estados Unidos após 1840. O gênero *Rubus* apresenta formas de reprodução sexuada e assexuada, e a hibridação entre as espécies torna a taxonomia do grupo bastante complicada (ALICE, 2002).



Figura 4. Frutos e aspecto das plantas da cultivar de amora-preta *Xavante*.

Fonte: EMBRAPA.

Três grupos de amoras foram domesticados: O primeiro, das amoras européias, o segundo, no leste da América do Norte e o terceiro grupo, no oeste da América do Norte. No Brasil ocorrem cinco espécies nativas de amoras: *R. urticaefolius*, *R. erythroclados*, *R. brasiliensis*, *R. sellowii* e *R. imperialis* (REITZ, 1996). Nenhuma das espécies brasileiras foi domesticada. As cultivares de amoras utilizadas no país são o resultado de introduções, hibridações e seleções de cultivares americanas. No Brasil, o programa de melhoramento com amora preta foi iniciado na década de 70 (RASEIRA *et al.*, 1994), com a introdução dos cultivares: *Brazos*, *Cherokee*, *arapho*, *Comanche*, *Tupy*, *Guarany*, e *Caingangue*.

Todas estas cultivares foram analisadas neste estudo. Alguns compostos da *Rubus* já foram identificados e isolados. No geral 5 antocianos foram encontrados em *Rubus*: cianidina 3-glucosídeo (principal antociano), cianidina 3-rutinosídeo, cianidina 3-glucosídeo acilada com ácido malônico, cianidina xylose, e cianidina 3-dioxalil-glucosídeo. A presença de outros compostos como ácido elágico, quercetina, canferol, catequina, e epicatequina foram observados (STINTZING *et al.*, 2002; SIRIWOHARN *et al.*, 2004).

Vários efeitos biológicos têm sido atribuídos a estes compostos, visto que são capazes, por exemplo, de inibir a peroxidação de lipídeos e a agregação de plaquetas, e de ativar sistemas enzimáticos, incluindo ciclooxigenases e hipoxigenases, as quais se relacionam com a resposta inflamatória. Esses efeitos são devidos fundamentalmente à sua capacidade de remover radicais livres e de quelar cátions divalentes. Com isso, faz-se relevante o estudo de compostos naturais, como os polifenóis, uma vez que várias pesquisas têm demonstrado que tais compostos apresentam importantes efeitos fisiológicos (SELLAPPAN *et al.*, 2002).

5 CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

Os métodos cromatográficos são normalmente utilizados em laboratório de análise para a determinação qualitativa e quantitativa de fármacos, produtos acabados, matérias-primas, fitoterápicos e amostras biológicas em todas as fases do desenvolvimento, desde a pesquisa até o controle de qualidade. Assim, a validação de método analítico é realizada para garantir que o mesmo seja exato, específico e reprodutível.

A validação de um método consiste, basicamente, em verificar as condições necessárias e suficientes para a garantia da qualidade dos resultados obtidos durante sua aplicação. A rigor, a avaliação dos resultados e o estabelecimento dos limites de confiança são condicionados pela complexidade do método, precisão e sensibilidade dos instrumentos, composição e homogeneidade amostrais, além de outras exigências analíticas incidentes. De um modo geral, quanto menor o número de etapas que constituem o método e quanto mais homogêneo e uniforme o material a ser analisado, menor será o erro.

Uma das tendências atuais é ampliar as informações em tabelas de composição química dos alimentos no que se refere a micronutrientes e compostos bioativos, particularmente sobre novas variedades de alimentos que podem ser introduzidos na alimentação da população, visando segurança alimentar (Tabela Brasileira de Composição Alimentar). Esse tipo de informação é essencial para o campo de nutrição, saúde e segurança alimentar como também para a economia por causa das exportações. Entretanto, todo este processo para a geração de dados de qualidade necessita estar delineado por critérios básicos que envolvem em linhas gerais, conceitos de abrangência, harmonização e especialmente, representividade.

Dessa forma, o presente trabalho teve por objetivo: desenvolver e validar uma metodologia analítica para realizar a caracterização química das frutas de *Vaccinium ashei* Reade e *Rubus* sp. por cromatografia líquida de alta eficiência, visando à identificação e quantificação dos principais compostos bioativos.

Para a validação do método foram utilizados parâmetros conforme normas estabelecidas pela Conferência Internacional de Harmonização (ICH, 2006), Farmacopéia Americana (USP) (2005) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) RE n° 899 (Brasil, 2003).

5.1 Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for quantitation of anthocyanidins in blackberry (Rubus sp.) and blueberry (Vaccinium ashei).

A ser submetido à revista *Química Nova*
(em preparação)

5.2 Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for quantitation of flavonoids in berries

A ser submetido à revista *Journal of Chromatography, B*
(em preparação)

Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for quantitation of anthocyanidins in blackberry (*Rubus* sp.) and blueberry (*Vaccinium ashei*) cultivars.

Maria Rosana Ramirez^a, Ana Lucia Aboy^a, Daniela Marti Barros^b, Maria do Carmo Bassols Raseira^c, Amélia Teresinha Henriques^{a*}.

^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, 90.610-000, Porto Alegre - RS.

^b Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Av. Itália Km 8, 96201-900, Rio Grande - RS, Brazil.

^c EMBRAPA/ CLIMA TEMPERADO, Rodovia BR 392, Km 78, caixa postal 403, 96001- 970, Pelotas, RS, Brazil.

Abstract

A HPLC/DAD method for the analysis of anthocyanidins in berries has been developed. Chromatography was performed with phase mobile containing a mixture of water and acetonitrile (100%) containing 0.1% TFA with a flow rate of 8 mL/min. using a Symmetry C₁₈ reverse-phase column (Waters). The acid hydrolysis simplifies the anthocyanins profile in blueberry sample and converts fifteen anthocyanins to five anthocyanidins: delphinidin, cyanidin, peonidin, petunidin and malvidin. Each of these aglycones can be separated and quantified accurately with external standard. The method is specific, precise, accurate, robust and, can be used for the study of anthocyanidins from biological sources.

Keywords: HPLC; anthocyanidin; validation; DPPH

* amelia@farmacia.ufrgs.br

INTRODUCTION

The beneficial effects of consuming fruits and vegetables for good health and disease prevention are well-known, these foods are considered essential to maintaining a healthy and balanced diet. Evidence from our lab indicates that fruit in particular blueberry¹ and blackberry² extracts are able to ameliorate age-related declines in neuronal and cognitive function, common in disorders neurodegeneratives. Many of their health-promoting characteristics are partly linked to the presence of an array of important phenolic phytochemicals.

Blackberry (*Rubus* sp.) and blueberry (*Vaccinium ashei*) are rich sources of dietary phenolic compounds such as anthocyanins, flavonoids that may act as normal antioxidants³ in our diet. Public interest in the health benefits of anthocyanins for reducing chronic diseases⁴ has stimulated the nutritional supplement industry to develop functional foods or supplements containing these ingredients. Analytical control of the content of these products makes it possible to solve many problems including that of determining adulterated products.

In fruits and plants, anthocyanidins occur as glycosylated forms, anthocyanins (glycosylated polyhydroxy derivatives of 2-phenylbenzopyrylium salts), and the complex anthocyanidins glycoside pattern can be reduced to six major anthocyanidins⁵ by acid hydrolysis, these common aglycon forms, are cyanidin, delphinidin, peonidin, petunidin, malvidin, and pelargonidin. There are many papers on analysis of anthocyanins in fruit and vegetables but, only a few papers reported⁶ the quantification of anthocyanidins aglycones. The biological activity of anthocyanins varies with their aglycones, for example, cyanidin⁷ had a higher oxygen radical absorbing capacity than that of pelargonidin or malvidin. Additional studies have found that acylated anthocyanins inhibit α glucosidase and reduce glucose uptake⁸ in rats; glucosidase inhibition by berry extracts is related to their anthocyanin content.

These finding suggests the necessity for development of simple and accurate methods for quantification of individual anthocyanidins. In the present study, we developed an acid hydrolysis HPLC method for quantification of individual anthocyanidins in *Rubus* sp. and *Vaccinium ashei*, Reade (*Ericaceae*), commonly known as rabbiteye blueberries, extracts

from cultivars not previously analysed, developed by the Brazilian Agricultural Research Corporation.

EXPERIMENTAL

Preparation of lyophilized fruit extract and quantification

Representative sample of *Rubus* blackberries and *Vaccinium ashei* blueberry were collected at random from the cultivars: *Guarani* and *Delite* respectively. Fruit were produced by EMBRAPA DE CLIMA TEMPERADO, Pelotas, RS, Brazil, and kept at -0.5 °C. Fresh berries from the cultivars described above were triturated mechanically and later lyophilized and kept sheltered from light.

Acid hydrolysis of anthocyanins: The pigments were hydrolyzed for 1 h at 100 °C, in water/methanol solution containing 2 N HCl. Samples were immediately cooled to room temperature for HPLC analysis.

Chemicals and reagents

Anthocyanidins standard were purchase from Sigma (St. Louis, USA); acetonitrile (HPLC grade) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and trifluoroacetic acid (analytical grade) was obtained from Nuclear (Diadema, Brazil).

Analytical methods

Identification and quantification of each compound was based on retention time and UV/VIS spectra in HPLC-DAD (Waters 2695), by comparison with pure commercial standards of known concentrations, using a Symmetry C₁₈ reverse-phase column (Waters). Gradient of mobile phase (A) water 0.1% TFA, (B) acetonitrile 0.1% TFA with a flow rate of 0.8 mL/min. Linear gradient, initial percentage of B (15%) to 50 minutes (100%); 10 µL injection. Absorption of anthocyanidins was registred at 520 nm. The mobile phase was prepared daily, filtered through a 0.45 µm membrane filter (Millipore) and sonicated before use. The standard cyanidin chloride was accurately weighted and diluted in methanol solution containing 2 N HCl (1mg/mL). Standard solution (after dilution), was injected

separately under directed HPLC conditions to generate curves for reference compound, and R^2 values exceeding $R^2 \geq 0.99$ (peak areas vs concentration).

Validation of the analytical method

The HPLC method was validated according to well established⁹ protocol, in agreement with International Conference on Harmonization guidelines. The method being examined for specificity, linearity, accuracy, precision, LOD and LOQ. For specificity validation, a volume of 10 μ l of standard, sample or blank solution was injected into the HPLC column and analyzed using an HPLC method as described above.

Linearity

The linearity between peak area and concentration was analyzed using three calibration curves obtained in same day with standard solutions of cyanidin at 8 different concentrations each, ranging from 0.0125 to 0.8 μ g mL. The linearity was evaluated by linear regression analysis, which was calculated by the least square regression method.

Accuracy

The accuracy of the method was accessed by analyzing samples of *Rubus* and *Vaccinium ashei* that were spiked with known amounts of cyanidin standard solutions in triplicate. Sample recovery rate for the cyanidin from sample solutions were calculated as described by Cass e Degani⁹.

Precision

The precision was carried out by repeatability (within-day) and intermediate precision (inter-day). The intra-day and inter-day precision values were obtained by triplicate analyses for each day and also per day over a 3-day period, respectively; and the repeatability of the assay method was evaluated by carrying out six independent assays of sample and calculated the % R.S.D.

Detection (LOD) and Quantification (LOQ) limits

Detection and quantification limits were estimated by the slope and mean standard deviation of standard cyanidin concentrations employed to construct the calibration curve, according to Eqs. (3) and (4).

$$\text{LOD} = \frac{3.3\sigma}{S}$$

where LOD is the estimated detection limit ($\mu\text{g/mL}$); σ , the standard deviation of y -intercepts of regression lines; S is the slope of the calibration curve.

$$\text{LOQ} = \frac{10\sigma}{S}$$

where LOQ is the estimated quantification limit ($\mu\text{g/mL}$); σ , the standard deviation of y -intercepts of regression lines; S is the slope of the calibration curve. LOQ is defined as the lowest concentration of the analyte that can be determined with acceptable precision and accuracy under the stated experimental conditions.

Robustness

Robustness is defined as the capability of an analytical procedure to remain unaffected by small but deliberate changes in the method parameters. Sample solutions were prepared and analyzed under the established conditions and by varying the flow rate.

RESULTS AND DISCUSSION

The mobile phase selection was based on peak parameters (symmetry, tailing), run time, ease of preparation and cost. Figure 1 shows a typical chromatogram which was obtained from the analysis of a standard and a sample solution of berries using the proposed method. The retention time observed (15 min) allowed a rapid determination of the peak which is important for routine analyses. The calibration curves for cyanidin were constructed by plotting peak area vs. concentration, and showed good linearity. The

representative linear equation was $Y = 40000000x + 769058$, with correlation coefficient ($r = 0.9981$) highly significant for the method.

The results of the LOD and LOQ analyses for the cyanidin was 0.026 and 0.079 $\mu\text{g/mL}$, respectively, indicating that the analytical method for the quantification of the compound exhibited good sensitivity. The method precision was determined by repeatability (within-day) and intermediate precision (inter-day) and was expressed as R.S.D (%) of a series of measurements. The results of such investigations are summarized in table 1. The corresponding finding indicated that the analytical method for quantification of the cyanidin revealed good precision.

Good related recovery rates for cyanidin were obtained: 90.03, 95.52, $101.15 \pm 0.70\%$ for *Rubus* and 93.69, 100.01, $101.70 \pm 0.62\%$ for *Vaccinium ashei*. The obtained values were very reproducible in all the three concentrations evaluated, indicating that the analytical method for the quantification of the cyanidin exhibited quite good accuracy.

Robustness is defined as the capability of an analytical procedure to remain unaffected by small but deliberate changes in the method parameters. The method was found to be robust when the flow rate was varied. The peak area was determined for each condition normal (2.277 $\text{mg}^0\%$), flow 0.6 (2.278 $\text{mg}^0\%$), flow 0.8 (2.326), and the method showed to be robust .

Analysis of berries samples

Small fruit have been known to contain anthocyanin pigments abundantly and thus have been used as a medicine or a source of health food/dietary supplement. Aglycones of anthocyanins¹⁰ are bound to sugar at the C3 and sometimes also at C5, C7 positions and exist in the glycosylated form.

The HPLC analysis gives information of the anthocyanins profile and is very useful for the control of products quality, identification of sample origins, and examination of raw materials. The major challenge for HPLC quantitation of anthocyanins is often the difficulty in obtaining the reference compounds. Cyanidin is usually used as a reference compounds to calculate total anthocyanins, but the molar absorbance difference of individual anthocyanidins at selective wavelength and the incomplete separation of anthocyanins¹⁰ will influence the accuracy of quantitative results.

However, the complex anthocyanidins glycoside can be reduced to six major anthocyanidins (pelargonidin, delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin, and malvidin) by acid hydrolysis. Mass chromatograms¹¹ of each aglycon indicated that rabbiteye blueberry possessed 15 anthocyanins, consisted of delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin, and malvidin attached with galactose, glucose, or arabinose at the C-3 position. The results of this study show that, after 1-h acid hydrolysis fifteen anthocyanins contained in the *Vaccinium ashei* extract became 5 peaks, corresponding to delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin, and malvidin (Figure 1c).

Previous reports have been done on blackberry (*Rubus* sp.) anthocyanins, and their identities have been well-characterized¹² as being solely cyanidin-based compounds. In particular, five anthocyanins are detected and cyanidin-3-glucoside was the major one (figure 1d).

This HPLC method has been validated and revealed a good specificity for the analysis of the anthocyanidins contained in berries, as demonstrated by the results shown in Figure 1., these results are in agreement with previous findings¹⁰⁻¹².

The amount of cyanidin was calculated using the cyanidin chloride standard curve after complete hydrolysis of glycoside in the berries sample. In this way, we have found that the total amount of anthocyanidins in *Rubus* (cultivar Guarani) was 4.3837 mg% and in *Vaccinium* (cultivar Delite) was 9.3642 mg%; cyanidin was the most predominant anthocyanidin followed by delphinidin, malvidin, petunidin and peonidin (Table 2).

The separation process for the five anthocyanins from *Vaccinium ashei* was performed in 30 min. Simultaneous quantification of all these compounds in a single operation is more convenient than using several separate procedures, especially for routine analysis or for a large number of samples. One of the greatest advantages is the simplification of the overall analytical process, for example, by reducing the frequency of changing the separation system, the number of sample injections and mobile phase preparations, and also reducing the number of times the calibration curves have to be made.

CONCLUSIONS

Identities of major anthocyanidins were confirmed in both berries cultivars, not previously evaluated. Acid hydrolysis greatly simplifies the anthocyanidin separation and

the five anthocyanidin aglycones could be completely separated. It is a simple method because no complex pre-treatment of the sample is necessary before analysis, only a simple filtration step is necessary to prevent pre-column obstruction. Such a technique seems to be convenient, which is very applicable for the simultaneous accurate quantification of anthocyanidins found in various fruits and vegetables, especially for routine analysis or for a large number of samples.

References

1. Ramirez, M. R.; Izquierdo, I. A.; Bassols M. C. R.; Zuanazzi, J. A.; Barros, D. M.; Henriques, A. T.; *Pharmacol. Res.* **2005**, *52*, 457.
2. Ramirez, M. R.; Hoff, M. L. M.; Moreira, F. J. C.; Henriques, A. T.; *Resumos da 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Águas de Lindóia, Brasil, 2008.
3. Ramirez, M. R.; Bassols, M. C. R. Henriques, A. T. *Resumos do I Congresso Sul de Toxicologia Clinico-Laboratorial*, Porto Alegre, Brasil, 2008; Ramirez, M. R.; Henriques, A. T.; *J. Brazilian Soc. Food Nutr.* **2007**, *32*, 28.
4. Barros, D. M.; Amaral, O. B.; Izquierdo, I.; Geracitano, L.; Bassols M. C. R.; Henriques, A. T.; Ramirez, M. R.; *Behav. Brain Res.* **2006**, *84*, 229; Cerqueira, F. M.; Medeiros, M. H. G. Augusto, O.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 449.
5. Ramirez, M. R.; Aboy, A. L.; Henriques, A. T.; Bassols, M. C. R. *Resumos da 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Águas de Lindóia, Brasil, 2008.
6. Zhang, Z.; Kou, X.; Fugal, K.; Mc Laughlin J. J.; *Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 688.
7. Wang, H.; Cao, G.; Prior, R. J.; *Agric. Food Chem.* **1997**, *45*, 304.
8. Matsui, T.; Ebuchi, S.; Kobalashi, M.; Fukui, K.; Sugita, K.; Terahara, N.; Matsumoto, K.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 7244.
9. International Conference on Harmonization (ICH); *Guidance for industry Q2B: Text on Validation of Analytical Procedures*, November 1996; Guide for Validation of Analytical and Bioanalytical Methods. Resolution RE n^o. 899, *Brazilian Sanitary Surveillance Agency*, Brasilia, Brazil, **2003**; Shabir, G. A.; *J. Chromatogr. A* **2003**, *987*, 57; Jenke, D. R. J.; *Liq.*

Chromatogr. Relat. Technol. **1996**, *19*, 737; Cass, Q. B.; Degani, A. L. G.; São Paulo: *Universidade Federal de São Carlos*, **2001**.

12. Siriwoham, T.; Wrolstad, R. E.; Finn, C. E.; Pereira, C. B.; *J. Agric. Food Chem.* **2004**, *52*, 8021.

Table 1. Validation of precision of analytic method for Cyanidin from blueberries and blackberries.

Precision	Cyanidin concentration (mg%)	
	<i>Rubus</i>	<i>Vaccinium</i>
Intra-day precision (n=3) ± RSD%	4.3799 ± 0.33	2.8741 ± 1.51
Inter-day precision (n=6) ± RSD%	4.8786 ± 0.73	2.8642 ± 1.35
Repetibility (n=6) ± RSD%	4.2918 ± 0.57	2.9432 ± 1.58

Table 2. Concentration (mg % \pm RSD) of anthocyanidins in blueberries and blackberries samples.

Anthocyanidin concentration (mg%)		
	<i>Rubus</i> sp.	<i>Vaccinium ashei</i>
Cyanidin (n=3) \pm RSD%	4.3837 \pm 1.57	2.9057 \pm 1.50
Delphinidin (n=3) \pm RSD%	ND	2.4182 \pm 0.35
Petunidin (n=3) \pm RSD%	ND	1.3630 \pm 1.41
Peonidin (n=3) \pm RSD%	ND	1.1342 \pm 2.61
Malvidin (n=3) \pm RSD%	ND	1.9430 \pm 4.12

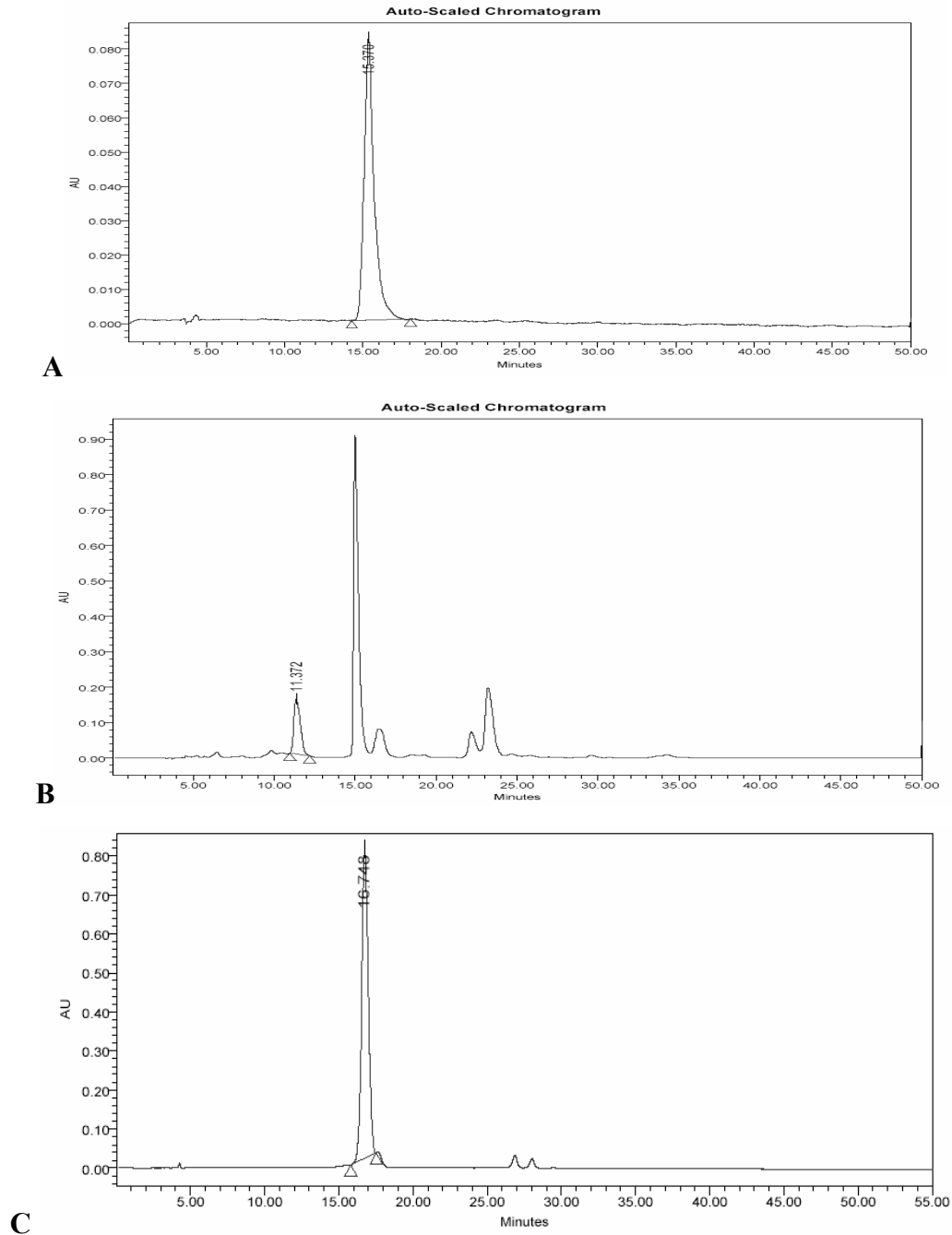


Fig. 1. A: Specificity validation for the HPLC analytical methods for cyanidin chloride (15.4 minutes), **B:** Typical HPLC chromatograms of blueberry sample showing delphinidin (11 min), cyanidin (co-injected with the standard), petunidin (16,5 min), peonidin (22 min) and malvidin (23.5 min). **C:** HPLC chromatograms of *Rubus* sp.

Development and validation of a high-performance liquid chromatographic method for quantitation of flavonoids in berries (*Vaccinium ashei* and *Rubus sp.*).

Maria Rosana Ramirez^a, Ana Lucia Aboy^a, Daniela Marti Barros^b, Maria do Carmo Bassols Raseira^c, Amélia Teresinha Henriques^{a*}

^a Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Av. Ipiranga, 2752, CEP 90.610-000, Porto Alegre (RS).

^b Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), (96201-900), Rio Grande, RS,

^c EMBRAPA/ CLIMA TEMPERADO, Pelotas, RS, Brazil.

Abstract

HPLC method for the analysis of flavonoids in blackberries and blueberries extract has been developed. This analytical procedure gives information of the flavonoids profile and is useful for the control of product quality, identification of botanical raw materials, monitoring the consistency of the raw material source and quantification the flavonoids. Main identified compounds were rutin, quercitrin, hyperoside and isoquercetrin.

The method was specific, linear, precise, robust and could be applicable to other botanical extract. The response was linear; the range of recoveries was 94.5 - 111.9%. The RSD for intra- and inter-day precision were < 0.55 and < 6.73%, respectively. Fifteen cultivars of berry were analyzed and the content of rutin ranged from 1.77 - 4.08, $\mu\text{g g}^{-1}$ of fruit liophilized.

Keywords: HPLC; berries; flavonoids; validation

* e-mail: amelia@farmacia.ufrgs.br

Introduction

Recent and renewed interest in plants and fruit extracts has led to an increased require for efficient methodologies for the assurance of standardization, reproducibility, efficacy, safety and quality of those varieties of raw materials. The actual importance on the use of compounds derived from natural sources occurs due to the presumable safe utilization, ecological preservation, and reduced ambient impact [1].

Fruits like blackberry (*Rubus* sp.) and blueberry (*Vaccinium* sp) are rich sources of flavonoids that may act as normal antioxidants in our diet, and pharmaceutical, cosmetic and food industries present interest on their utilization, to develop functional foods or herbal sumpplements containing these ingredients [2,3]. When the active compounds are not known, it has been hypothesized that is possible to standardize the extracts in reference of the major of the chemical constituents as the analyte [4].

There are many papers on analysis of flavonoids in fruits and vegetables, however only a few papers reported the quantitation of flavonoids glycosylated, without hydrolisys step. It is of great relevance to study thoroughly the actions of the glycosylated compounds as they are the native forms occurring in plant as well as in fruit extracts. The role of glycosides in diets has become even more significant as it was found that in the human and rodents gastrointestinal tract flavonoids, may be absorbed into the circulation, and that they are able to cross the rat blood-brain barrier after (blueberry, blackberry) supplementation, suggesting that these compounds can have a direct effect on brain processes [5,6].

These results suggest the necessity for development of simple and accurate methods for quantification of flavonoids glycosylated. The aim of this study was to propose, develop and validate a HPLC method for individual flavonoids (expressed in rutin) quantification from blackberry and blueberry cultivars. Analytical method validation was carried out by establishing parameters, like: linearity, specificity, precision, accuracy, detection and quantification limits [7].

Materials and Methods

Preparation of lyophilized fruit extract and quantification

Representative sample of *Rubus* blackberries (subgenus *Rubus* Watson) and *Vaccinium ashei* blueberry were collected at random different cultivars. Plants were produced by EMBRAPA DE CLIMA TEMPERADO, Pelotas, RS, Brazil, and kept at - 0.5 -0°C. Pesticide analysis was previously carried out and no sign of these substances was found, assuring no interference of pesticides on our results. Fresh berries were triturated mechanically and later lyophilized and kept sheltered from light.

Chemicals and reagents

Rutin standard were purchase from Sigma (St. Louis, USA); acetonitrile (HPLC grade) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and trifluoroacetic acid (analytical grade) was obtained from Nuclear (Diadema, Brazil). All other chemicals were analytical grade.

Analytical methods

Identification and quantification of each compound was based on retention time and UV spectra in HPLC-DAD (Waters 2695), by comparison with pure commercial standards of known concentrations, using a X Terra column (Waters). Gradient of mobile phase (A) water 0.1% TFA, (B) acetonitrile 0.1 % TFA with a flow rate of 0.8 mL/min, column temperature, 26 °C. Ultraviolet visible absorption spectra of flavonoids were detected at 356 nm. Rutin, selected as the standard, was dissolved in methanol solution (1mg/ml), standard solution (after dilution), was injected separately under directed HPLC conditions to generate curves for reference compound, and R^2 values exceeding $R^2 \geq 0.99$ (peak areas vs concentration).

Validation of the analytical method

The HPLC method was validated according to well established protocol, in agreement with International Conference on Harmonization guidelines (ICH 2006) [8,9]. The method was examined for specificity, linearity, accuracy, precision, LOD and LOQ

[9]. For specificity validation, a volume of 10 µl of standard, sample or blank solution was injected into the HPLC column and analyzed using an HPLC method as described above.

Linearity

The linearity between peak area and concentration was analyzed using three calibration curves obtained in same day with standard solutions of rutin at 8 different concentrations each, ranging from 1.57 to 2.70 µg/mL.

Accuracy

The accuracy of the method was accessed by analyzing samples of *Rubus* and *Vaccinium* that were spiked with known amounts of rutin standard solutions. Sample recovery rate for the rutin from sample solutions were calculated according by Cass and Degani, 2001 [10,11].

Precision

The precision was performed in three different levels: repetibility, intra-day precision and inter-day precision. The intra-day and inter-day precision values were obtained by triplicate analyses for each day and also per day over a 3-day period, respectively; and the repeatability of the assay method was evaluated by carrying out six independent assays of sample and calculated the % R.S.D.

Detection (LOD) and Quantification (LOQ) limits

Detection and quantification limits were estimated by the slope and mean standard deviation of standard rutin concentrations employed to construct the calibration curve, according to Eqs. (3) and (4) [8,9]:

$$\text{LOD} = \frac{3.3\sigma}{S}$$

where LOD is the estimated detection limit (µg/mL); σ , the standard deviation of y intercepts of regression lines; S is the slope of the calibration curve.

$$\text{LOQ} = \frac{10\sigma}{S}$$

where LOQ is the estimated quantification limit ($\mu\text{g/mL}$); σ , the standard deviation of y -intercepts of regression lines; S is the slope of the calibration curve.

Robustness

Robustness is defined as the capability of an analytical procedure to remain unaffected by small but deliberate changes in the method parameters. Six sample solutions were prepared and analyzed under the established conditions and by varying the following analytical parameters: pH of the mobile phase and flow rate.

Results and Discussion

The method was fully validated showing satisfactory data for all the method validation parameters tested. As demonstrated by the results shown in Fig. 1a, a good separation effect for these compounds from *Rubus* was obtained with our methodology.

The linear equation and the determination coefficient (r^2) were respectively: $Y = 237999x + 144333$, 0.9923. The result shows that an excellent correlation existed between the peak area and concentration of the analyte.

The results of the LOD and LOQ analyses for the rutin ranged from 0.396 to 1.200 $\mu\text{g/ml}$, respectively, indicating that the analytical method for the quantification of the compound exhibited high sensitivity.

Good related recovery rates for rutin were obtained: 95.93, 94.56, $111.95 \pm 0.90\%$ for *Rubus* and 86.09, 92.01, $94.02 \pm 0.82\%$ for *Vaccinium ashei*. The values obtained are very reproducible in all three concentrations evaluated, indicating that the analytical method for the quantification of the rutin exhibited quite good accuracy. Relative small amount of R.S.D. (%), not exceeding the limit of 5 % confirmed the precision, reproductibility and repetibility of the method for rutin present in the extract.

The results of precision validation are summarized in table 1, the corresponding finding indicated that the analytical method for quantification of the rutin revealed good precision. To determine the robustness of the developed method, experimental conditions were deliberately altered and the resolution was recorded. The flow rate of the mobile phase was 0.8 ml/min. To study the effect of flow rate on the resolution, flow was changed by 0.2 units from 0.8 to 0.6 or 1.0 ml/min respectively. The peak area was determined for each condition and the method showed to be robust.

The peak area was determined for each condition normal (1.717 mg%), flow rate 0.6 (1.861 mg%), flow rate 1.0 (1.592), and the method showed to be robust .

Analysis of berries samples

The extract of *blackberry* (*Rubus* sp.) and *blueberry* (*Vaccinium ashei*) was standardized in individual flavonoids content, expressed in rutin. The qualitative composition of berry flavonoids was similar for all cultivars yet quantitatively very

different and 3 flavonoids were identified in all types of cultivars analyzed: quercitrin, hyperoside, isoquercitrin and plenty of rutin was found in blackberry extract (Table 2).

It should be noted that cultivars used in this research were collected from one location with the same environmental factors, still, substantial variations were found. Otherwise, these findings showed the potential for obtaining new cultivars with convenient flavonoids contents through classical plant breeding.

Conclusions

The separation process for the individual flavonoids from berry was performed within 15 min, besides, this analytical procedure presents application advantages comparing to other methods, such as: simplicity, rapidity, sensitivity, operational convenience, low cost of equipment and reagents.

Simultaneous quantification of all these compounds in a single operation is more convenient than using several separate procedures, especially for routine analysis or for a large number of samples. One of the greatest advantages is the simplification of the overall analytical process, for example, by reducing the frequency of changing the separation system, the number of sample injections and mobile phase preparations, and also reducing the number of times the calibration curves have to be made.

Such a technique results convenient, which is applicable for the simultaneous accurate quantification of numerous compounds found in blackberries and blueberries, especially for a large number of samples. The method was fully validated showing satisfactory data for all the method validation parameters tested, and could be applicable to other extracts.

Acknowledgments

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), foundation linked to the Ministry of Science and Technology (MCT), to support Brazilian research, PIBIC/CNPq.

References

- [1] L. Paniwnyk, E. Beaufoy, J.P. Lorimer, T.J. Mason, *Ultrason. Sonochem.* **8**, 299 (2001)
- [2] F. Bonina, M. Lanza, L. Montenegro, C. Puglisi, A. Tomaino, D. Trombetta, F. Castelli, A. Saija, *Int J Pharm* **145**, 87 (1996)[3] T. Siriwoharn, R.E. Wrolstad, C.E. Finn, C.B. Pereira, *J Agric Food Chem* **52**, 8021 (2004)
- [4] Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria da Vigilância Sanitária, Resolução no. 48/2004. Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil (2004)
- [5] D.M. Barros, O.B. Amaral, I. Izquierdo, L. Geracitano, M.C. Bassols Raseira, A.T. Henriques, M.R. Ramirez, *Behav Brain Res* **84**, 229 (2006)
- [6] M.R. Ramirez, I.A. Izquierdo, M.C. Bassols-Raseira, J.A. Zuanazzi, D.M. Barros, A.T. Henriques, *Pharmacol Res* **52**, 457 (2005)
- [7] G.A. Shabir, *J Chromatogr A* **57**, 987 (2003)
- [8] International Conference on Harmonization (ICH); *Guidance for industry Q2B: Text on Validation of Analytical Procedures*, November 1996.
- [9] Guide for Validation of Analytical and Bioanalytical Methods, Resolution RE no. 899, Brazilian Sanitary Surveillance Agency, Brasilia, DF, Brazil (2003)
- [10] Q.B. Cass, A.L.G. Degani, São Paulo: Universidade Federal de São Carlos (2001).
- [11] D.R. Jenke, *J Liq Chromatogr Relat Technol* **19**, 737 (1996)

Table 1. Precision of analytic method for rutin from Caingangue blackberry.

Precision	Rutin concentration (mg%) <i>Rubus</i>
Intra-day precision (n=3) \pm RSD%	1.6299 \pm 0.55
Inter-day precision (n=6) \pm RSD%	1.5781 \pm 4.73
Repeatability (n=6) \pm RSD%	1.9128 \pm 0.636

Table 2. Individual flavonoids in blueberries and blackberries (values are averages of triplicate analyses).

Cultivar	Rutin	Hyperoside+Isoquercitrin	Quercitrin
	(mg% fruit lyophilized \pm RSD%)		
<i>Rubus sp.</i>			
Caingangue	1.7477 \pm 0.52	6.0231 \pm 2.14	1.0023 \pm 0.56
Tupy	2.5533 \pm 2.44	6.7345 \pm 1.95	1.8755 \pm 6.68
Brazos	3.3433 \pm 4.54	5.7890 \pm 2.16	2.8733 \pm 2.16
Xavante	3.8244 \pm 0.29	8.6070 \pm 6.64	4.9366 \pm 6.64
Choctaw	3.9435 \pm 0.87	8.9582 \pm 1.33	3.9327 \pm 1.33
Guarani	1.7716 \pm 6.07	6.9832 \pm 4.82	1.5133 \pm 2.56
Arapho	3.6233 \pm 4.58	7.8571 \pm 2.83	2.7825 \pm 2.83
Cherokee	3.8765 \pm 3.14	8.2873 \pm 4.58	3.9972 \pm 4.58
Comanche	4.0824 \pm 0.86	9.8366 \pm 0.26	4.8295 \pm 2.47
<i>Vaccinium ashei</i>			
Alice Blue	ND	5.9654 \pm 0.20	8.8690 \pm 1.93
Bluegen	ND	1.6015 \pm 0.15	3.2966 \pm 1.11
Florida	ND	1.1110 \pm 0.14	3.9756 \pm 7.09
Delite	ND	1.0233 \pm 0.32	2.6529 \pm 4.90
Woodar	ND	8.4675 \pm 2.62	9.5687 \pm 0.12
Climax	ND	1.0011 \pm 2.81	2.1287 \pm 0.32

ND: not detected

Figure 1.

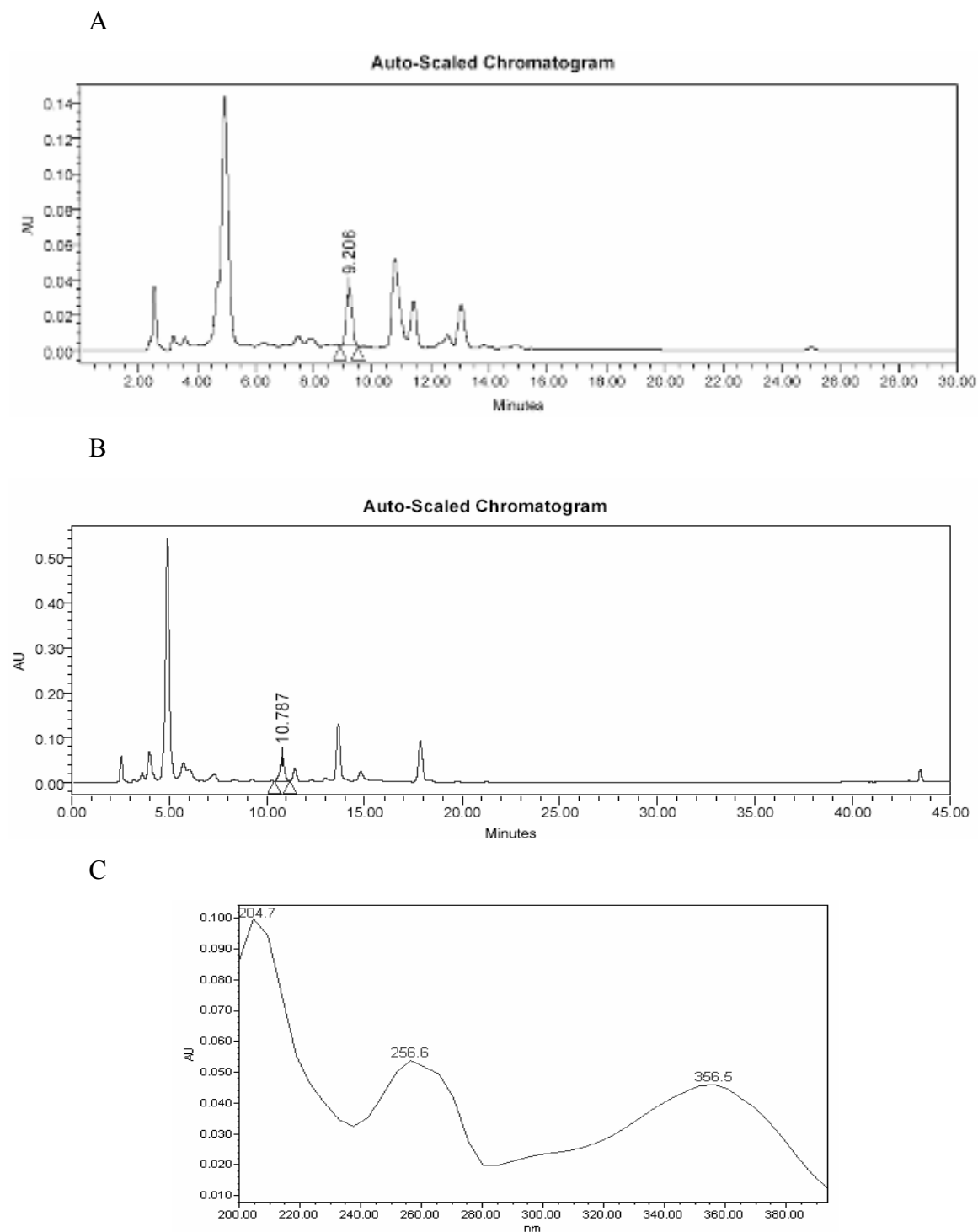


Fig. 1. Typical HPLC chromatograms of **A.** *Rubus* sample showing rutin (9 min) Hyperoside+Isoquercitrin (10,4 min), Quercitrin (13 min). **B.** *Vaccinium ashei* **C:** Shows in detail UV spectra of rutin peak.

6 CAPITULO II

INTRODUÇÃO

Durante as últimas décadas a preocupação do consumidor em relação à qualidade dos alimentos cresceu consideravelmente, juntamente com a procura por alimentos funcionais ou componentes alimentares ativos fisiologicamente, também designados bioativos. Em sua maioria, os compostos bioativos estão distribuídos entre as frutas, legumes, verduras, cereais, peixes, dentre outros. Eles são aproveitados no próprio consumo dos alimentos *in natura* ou isolados e inseridos em outro produto passando então a ser enriquecido com nutrientes (NACZK e SHAHIDI, 2004).

Paralelamente, a extração e a purificação de antioxidantes a partir de fontes naturais têm se tornado essencial para a utilização dessas substâncias como aditivos para produtos farmacêuticos e cosméticos, devido às suas propriedades, de retardar reações de oxidação em alimentos, inibir a danificação do DNA, e proteger o organismo humano de várias doenças degenerativas (HASLAM, 1996).

Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: com atividade enzimática e sem essa atividade. Na primeira estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. Na segunda estão às moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Esta classificação inclui antioxidantes naturais como os compostos fenólicos (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004).

A oxidação é um fenômeno ligado aos lipídeos insaturados, constituintes da estrutura das membranas biológicas e fundamentais para a funcionalidade das mesmas. Danos nesta camada lipídica tendem a alterar as propriedades físicas da membrana plasmática, fenômeno observado durante o processo de envelhecimento (incremento da rigidez) (CANTUTI-CASTELVETRI *et al.*, 2000).

A peroxidação pode ser inibida por antioxidantes que interrompem a cadeia, reagindo com os radicais formando hidroxiperóxidos, radicais livres formados a partir de um antioxidante. Estes antioxidantes interagem com o oxigênio singlete e fornecem átomos de hidrogênio para o radical peroxila dos

ácidos graxos, impedindo a reação em cadeia que se propaga nas membranas lipídicas. Portanto, é evidente que a oxidação lipídica pode causar importantes danos biológicos, que podem ter relação com o tipo de dieta não suprida de uma concentração adequada de antioxidantes, já que esses são agentes que neutralizam os radicais livres (SOARES, 2002; VALKO *et al.*, 2004; BARREIROS *et al.*, 2006).

Os antioxidantes são também classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio singlete, agentes quelantes e antioxidantes mistos. Os antioxidantes primários são os compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação através da doação de átomos de hidrogênio a estas moléculas, interrompendo a reação em cadeia (MOREIRA e MANCINI-FILHO, 2004).

Considerando-se a grande variedade de compostos bioativos do mirtilo, e na procura por alimentos mais saudáveis de uma maneira geral, o presente trabalho teve como objetivos: quantificar os compostos fenólicos, incluindo antocianinas e outros flavonóides em 9 cultivares de *Vaccinium ashei* Reade (mirtilo) cultivadas em Pelotas, através do método da Farmacopeia Europeia e Portuguesa respectivamente. Avaliar sua capacidade antioxidante frente ao DPPH pelo método de Blois (1953), bem como avaliar a atividade neuroprotetora através do ensaio cometa (SINGH *et al.*, 1988; TICE *et al.*, 2000) em ratos velhos, após administração crônica do extrato.

6.1 *Radical Scavenging Activity And Neuroprotective Effects Of Vaccinium ashei
Berries Intake In Old Rats.*

Submetido à revista: *Fitoterapia*

Radical Scavenging Activity And Neuroprotective Effects Of *Vaccinium ashei* Berries Intake In Old Rats.

Maria Rosana Ramirez^a, Ana Lucia Aboy^a, Daniela Marti Barros^{b,c}, Amélia Teresinha Henriques^{a*}, Laura Geracitano^c.

^a *Faculdade de Farmácia Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

^b *Programa de Pós-graduação em Ciências Fisiológicas, Fisiologia Animal Comparada (FURG).*

^{b,c} *Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), (96201-900), Rio Grande, RS, BRAZIL.*

Corresponding author:

* PHD. Amélia Teresinha Henriques

Faculdade de farmacia, UFRGS

Av. Ipiranga, 2752

CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

Phone (51) 3308-5258 - Fax (51) 3308-5214

e-mail: amelia@farmacia.ufrgs.br

Abstract

Different cultivars of *Vaccinium ashei* Reade were analyzed for flavonoids, anthocyanins, total polyphenols, and antioxidant capacity (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH). Consequently, the aim of this study was to establish whether total extract could act as putative antioxidant micronutrients. Old rats were treated with extract through oral (3.6 mg/kg day of the anthocyanins) for 6 months before assay. We found that, the antioxidant capacity of different cultivars studied ranged from a low of 49% to 80% Trolox equivalents/mg of anthocyanins. Consumption of the extract significantly reduced DNA damage in cortex tissue *in vitro*. Dietary consumption of polyphenols rich foods may contribute to overall antioxidant status, particularly in reducing oxidative stress associated with aging.

Keywords: *Vaccinium*, DPPH, polyphenols, DNA damage.

Introduction

Blueberries (Ericaceae) is one of the most popular and highly consumed fruit in the world, and it is used not only as foodstuff but also for the treatment of eyestrain. Rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei* Reade), contain great amounts of phenolics, such as flavonols and anthocyanins that may act as natural antioxidants in our diet [1]. Polyphenols, including some anthocyanins, possess oral bioavailability in rats and that they are able to cross the rat blood-brain barrier after berry supplementation, suggesting that these compounds can feasibly have a direct effect on brain processes [2].

In addition studies found that, dietary blueberry extracts can reverse certain age-induced declines in brain function such as those in learning, and motor performance [3, 4] thus, *Vaccinium* fruit and the polyphenols contained by them are thought to be possible functional foods for reducing risks of numerous diseases.

The present work focused on further characterization of berries grown in Brazil as possible sources of phenolics for functional foods application. We analyzed different varieties of blueberries *Vaccinium ashei* Reade (Rabbiteye), for total anthocyanins, total polyphenols, and antioxidant capacity as well as on DNA damage in the hippocampus and cerebral cortex in old rats.

Experimental

Representative samples of *Vaccinium ashei* Reade, (*Ericaceae*) berries were collected at random from the following cultivars: *Woodard*, *Delite*, *Climax*, *Bluegen*, *Bluebelle*, *Aliceblue* and *Florida* (all originally American). Two selection (77 and 110) from these cultivars. Plants were produced by EMBRAPA DE CLIMA TEMPERADO, Pelotas, RS, Brazil, and kept at - 0.5 -0°C. Pesticide analysis was previously carried out and no sign of these substances was found, assuring no interference of pesticides on our results. A mixture of fresh berries were triturated mechanically and later lyophilized and kept sheltered from light.

Compositional analyses

Total Anthocyanins Assay: was determined according to the procedure described in the European Pharmacopoeia (2002) [5], the absorbance was measured at 520 nm.

Estimation of Total Polyphenols. Total polyphenols were estimated colorimetrically using the Folin-Ciocalteu method [6]. The absorbance was measured at 760 nm with a Shimadzu UV-Visible spectrophotometer

Total flavonoids: were estimated by the method of Brazilian Pharmacopoeia (2003) [6]. Polyphenols and flavonoids fraction was then collected, and freeze-dried to powder. Compounds were analyzed for phenolic acids (including anthocyanins) and flavonoids. The identification of these compounds was done by the analyses of the ultraviolet light spectrum obtained in HPLC-DAD and by chromatography with standard solutions, retention time and UV spectra (data not shown). The UV-VIS (visible) spectra were recorded from 230 to 600 nm, with detection at 520 nm for anthocyanins.

Preparation of extract

Lyophilized berries were homogenized in 96% ethanol, mechanically agitated for 30 min and centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The supernatants were filtered through filter paper and concentrated by rotary evaporation at 30°C. After

relyophilization, extracts were stored until the time of administration to the animals, when they were redissolved in distilled water. The daily quantity of extract offered to the animals was calculated to provide 2.6 - 3.2 mg/kg/day oral of anthocyanins. The volume of juice provided was 30 ml/rat/day in all cases. The extract was kept sheltered from light. Food was available *ad libitum*. Juice intake and weight were recorded daily [7].

Measurement of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity.

In addition, the radical scavenging activity of the compounds was evaluated by using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical test. The method performed as described by Nakajima, et al., (2004) [8]. Each berry extract was dissolved and diluted in ethanol at concentrations of 2.0, 1.5, 1.0, 0.5, and 0.25 mg/mL. The DPPH (100 μ M), radical scavenging activity obtained by each berry extract was compared with that of Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, 97 %, Aldrich Chem. Co), an analog of vitamin E and the result is expressed as the percentage of radicals scavenged after 30 min of reaction time.

Subjects

The subjects were 10 adult male Wistar rats (aged 18 months), obtained from our own breeding colony. Animals were randomly assigned to each treatment group, drank water *ad libitum* and group which drank water supplemented with lyophilized *Vaccinium* berries extract for 6 months ($n= 5$ animals/group). The study was approved by the Animal Care and Use Committee of our center (Universidade Federal de Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil), and all efforts were made to reduce the number of animals used and their suffering. At the end of this period, animals in the control group and in group 2 were sacrificed. Hippocampi and cerebral cortices were dissected and used to test DNA damage through an alkaline single cell electrophoresis (comet) assay.

Alkaline single cell electrophoresis (comet) assay

DNA damage was evaluated through the alkaline single cell electrophoresis (comet) assay, performed as described by Singh, et al., (1988) [9] and Tice et al., (2000) [10], with some modifications. Hippocampi and cerebral cortices were homogenated in 500 μ l of cold (4 °C) phosphate-buffered saline solution (PBS). For each sample, an aliquot (30 μ l) was diluted in PBS to a final volume of 100 μ l and another aliquot (30 μ l) was diluted in PBS plus H₂O₂ (1 mM) to a final volume of 100 μ l. The *in vitro* assay with 1mM H₂O₂ was performed on ice for 5 min [11]. Finally, 10 μ l of these cellular suspensions were diluted in 80 μ l of low melting point agarose (0.65%) and added to fully frozen slides, which had been covered with a layer of 0.65% normal melting point agarose. Following layer solidification, cells in slides were lysed (2.5 M NaOH, 0.1 M EDTA, 0.01 M Tris, 1% sodium sarcosinate, 1% Triton X-100, and 10% dimethyl sulfoxide, pH 10,) overnight at 4 °C. Subsequently, samples were placed in the electrophoresis solution (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 13) for 30 min to allow DNA unwinding. Electrophoresis was then performed during 35 min at 25 V and 280 mA. Finally, slides were neutralized with 0.4 M Tris buffer (pH 7.5), stained with 50 μ l of ethidium bromide (20 μ g/ml) and analyzed using a Zeiss-Axioplan epifluorescence microscope (400x magnification). In 100 randomly selected cells in duplicated slides, DNA damage was classified as undamaged (class 0) or as presenting short migration of DNA (class 1), medium migration (class 2), long migration (class 3), and complete migration (no nucleus remaining, class 4). The final score was calculated by adding the scores for each cell in the slide, resulting in a final score of 0 for no DNA damage and 400 for maximum damage.

Statistical analysis

Determination of total phenolics, total flavonoids and total anthocyanins of each cultivar was carried out in triplicate experiments; data are expressed as mean and standard errors. DPPH was estimated in triplicate experiments. For alkaline single cell electrophoresis (comet) assay, data are expressed as mean and

standard errors and analyzed with one-way ANOVA. Independent t-tests measurement was madden between groups (control vs treated). In all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Results

Anthocyanin, flavonoids and total phenolic content are shown in table 1. The qualitative composition of berry polyphenolics was similar for all cultivars yet quantitatively very different, while chlorogenic acid, was the main phenolic acid in the extracts [12]. Three flavonoids were identified in all types of cultivars analyzed: quercitrin, hyperoside and isoquercetrin. Moreover, the total flavonoids concentrations were considerably lower than those reported by Sellapan et al. (2002) [13]. Anthocyanins found in *V.ashei* consisted of delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin, and malvidin attached with galactose, glucose, or arabinose at the C-3 position, and the total proportions of individual anthocyanins varied among cultivars (data not shown).

The wide range of phytochemicals and DPPH values found in the *Vaccinium ashei* analized, indicates that the genetic variability is present to potentially develop cultivars with enhanced health benefits (Figure 1). We also examined the antioxidant capacity of polyphenols and flavonoids fraction as it is presented in figure 2. Notably, both fractions showed strong levels of radical scavenging activity (58% and 47% respectively) to total berry extract (75%). These results are in agreement with previous studies [14], showing that the compounds responsible for the antioxidant capacity most likely can be accounted for by the phenolic acids, anthocyanins, and other flavonoid compounds

The antioxidant rich phytochemicals in berries have been shown in mice models to reduce or retard the central nervous system deficits seen in aging [2,3]. In our study, H₂O₂ induced DNA strand breaks were reduced in old rats treated with the berry extracts (figure 3b). The animals started treatment at the age of 18 months to 24, this can partly explain why extract do not protect against basal DNA damage. This limited protection could be associated with alterations in membrane

fluidity (aging process), and consequently with intracellular distribution of polyphenols including anthocyanins (in plasma membrane or in proximity of the DNA) [2]. Similar results has shown previously by the reduction of DNA damage in elderly people [16], and animals supplemented with fruit extracts [17] including berries containing ellagic acid and quercetin. Possible mechanisms for these genoprotective effects include protection of DNA from alkylation or formation of anthocyanin-DNA complexes, which stabilize the molecule against oxidative attack [18]. While the oxidative DNA damage can play a considerable role in aging, inflammatory, atherosclerosis, coronary heart disease, and other pathologies [2], the decrease of the oxidative stress seems to be the good strategy possible to achieve by attractive nutritional supplements formulations containing blueberry polyphenols.

Acknowledgements: Work supported by, FAPERGS (Grants N° 04/0023.1 and N° 04/0498.9), and LAG is PD fellow CNPq, Brazil. We are thankful to Dr. Paulo Abreu for the use of the epifluorescence microscope and Dr. José María Monserrat to theoretical and practical helps.

References

- [1] Rimando AM, Kalt W, Magee JB, Dewey J, Ballington JR. *J. Agric Food Chem* 2004;52: 4713.
- [2] Andrés-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA. *Nutrit. Neurosci* 2005;8:111.
- [3] Bickford PC, Gould T, Briederick L, *et al.* *Brain Res* 2000; 866:211.
- [4] Ramirez MR, Izquierdo IA, Bassols-Raseira MC, Zuanazzi JA, Barros D, Henriques AT. *Pharm Res* 2005;52, 457:462.
- [5] European Pharmacopeia Portuguesa 7 ed., Lisboa, 2002. CD-ROOM.
- [6] Brazilian Pharmacopoeia. 5 fasciculo 2003.
- [7] Barros DM, Amaral, OB, Izquierdo I, Geracitano L, Bassols Raseira MC, Henriques AT, Ramirez MR. *Behav Brain Res* 2006;84:229.
- [8] Nakajima J, Tanaka I, Seo S, Yamazaki M, Saito KJ. *Biomed Biotechnol* 2004;5:241.
- [9] Singh NP, McCoy M, Tice RR, Schneider E. *Exp. Cell Res* 1998;175:184.
- [10] Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi, H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. *Environ Mol Mutagen* 2000; 35:206.
- [11] Psimadas D, Messini-Nikolaki N, Zafiropoulou M, Fortos A, Tsilimigaki S, Piperakis SM. *Cancer Lett* 2000;204:33.

- [12] Taruscio TG, Barney DL, Exon J. J Agric Food Chem 2004; 52:3169.
- [13] Sellappan S, Akoh CC, Krewer G. J Agric Food Chem 2002;50:2432.
- [14] Kalt W, McDonald JE, Ricker RD, Lu X. Can J Plant Sci 1999;79:617.
- [15] Musonda CA, Chipman JK. *Carcinogenesis* 1998;19:1583.
- [16]. Sarma AD, Sharma R. Phytochemistry 1999;52:1313.
- [17] Halliwell B, Gutteridge JM. Methods Enzymol 1990;186:85.

Table 1. Individual Anthocyanins, Flavonoids and Polyphenols in Blueberries (values are averages of triplicate analyses).

<i>Rabbiteye blueberries</i> (<i>Vaccinium ashei</i> Reade)			
Cultivars	Anthocyanins	Flavonoids (mg/100g)	Polyphenols
<i>Bluegen</i>	881 ± 1.00	95 ± 0.34	1423 ± 3.66
<i>Climax</i>	887 ± 0.66	86 ± 0.67	1541 ± 10.7
<i>Woodard</i>	1000 ± 0.67	180 ± 1.00	1533 ± 7.66
<i>Delite</i>	885 ± 0.66	88 ± 0.33	1352 ± 5.00
<i>Blue belle</i>	1221 ± 6.66	115 ± 0.66	1724 ± 10.7
<i>Florida</i>	229 ± 1.33	52 ± 1.00	1000 ± 7.66
<i>Alice Blue</i>	565 ± 1.67	89 ± 0.66	1200 ± 6.33
<i>Seleção 77</i>	1277 ± 6.66	45 ± 0.33	1700 ± 11.3
<i>Seleção 110</i>	941 ± 1.33	87 ± 1.33	1100 ± 9.00

Table 1. Total anthocyanins were expressed as cyanidin-3-glucoside equivalents expressed per 100 gram of fruit liophilized. Polyphenols and Flavonoids concentration based upon pirogalol or quercetin respectively as standard expressed per 100 gram of fruit liophilized.

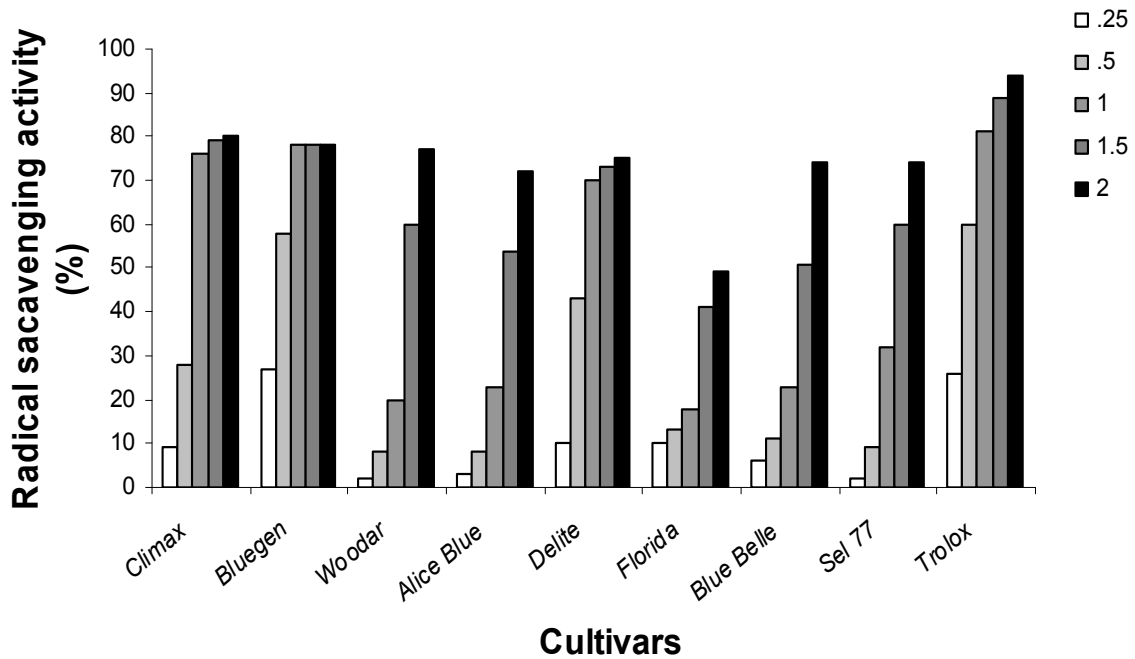


Figure 1. Radical scavenging activities of berry extracts. Extract was dissolved in ethanol at concentrations of 2.0, 1.5, 1.0, 0.5, and 0.25 mg/mL of anthocyanins. The blueberry extracts were incubated with DPPH for 30 minutes, and the absorbance at 517 nm due to DPPH radical was determined. Trolox was used as a control.

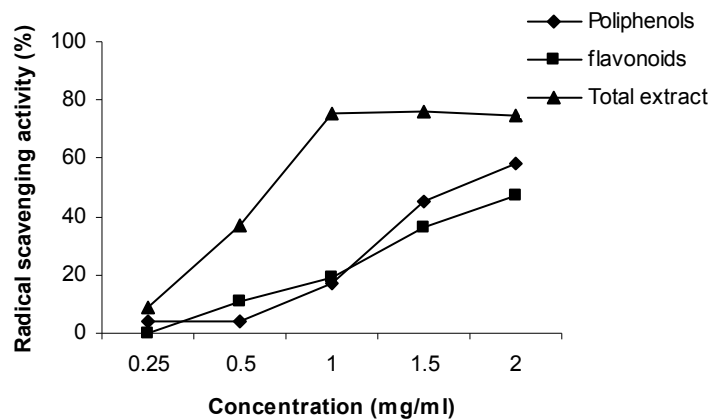


Figure 2. Radical scavenging activities of berry fractions. The blueberry fractions were incubated with DPPH for 30 minutes, and the absorbance at 517 nm due to DPPH radical was determined. Trolox was used as a control.

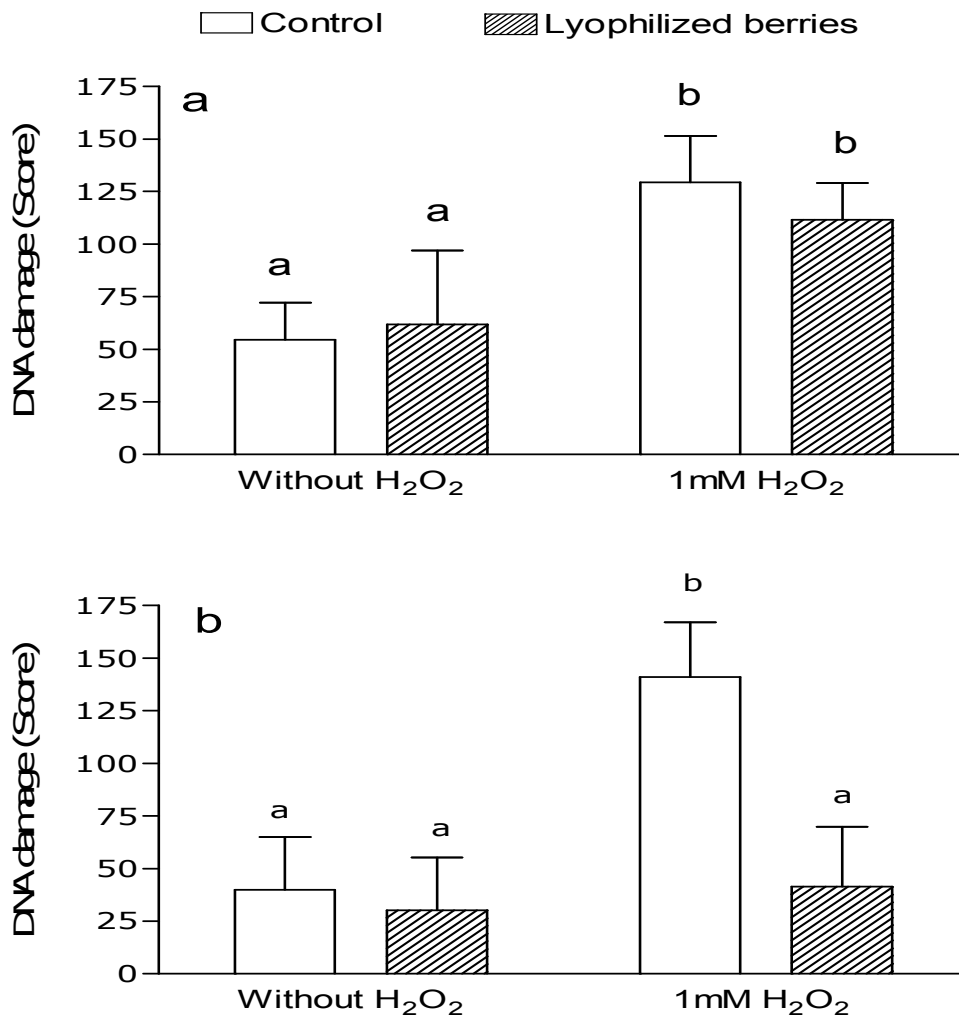


Figure 3. Effect of total *Vaccinium ashei* extract on DNA damage evaluated by alkaline single cell electrophoresis (comet) assay in hippocampal (a) and cortex tissue (b) with (white) and without (striped) treatment with 1 mM of H₂O₂. Values are mean ± S.E.M. (n=5). Similar letters mean absence of statistical differences (p>0.05) between groups, whilst different letters indicate significant differences (p<0.05).

7 CAPÍTULO III

INTRODUÇÃO

O conceito clássico, definido pela Associação Internacional para o Estudo da Dor, é que a dor seria *uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão* (DICKENSON 1995, 1997; MELZAC e LOESER, 1999; RAINVILLE, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2004). O mesmo grupo considera, atualmente, que a dor é sempre subjetiva. Cada indivíduo aprende a aplicação da palavra através de experiências relacionadas a lesões sofridas durante o crescimento (MERSKEY, 1991).

A dor é uma experiência complexa que não envolve apenas a transdução do estímulo nociceptivo ambiental, mas também cognitivo e emocional processado pelo sistema nervoso central (SNC) (JULIUS e BASBAUM, 2001; MELZACK e LOESER, 1999; RAINVILLE, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2004). Ela é comumente desencadeada pela ativação de nociceptores específicos (dor nociceptiva). No entanto, ela pode ser resultante de lesão nas fibras sensoriais, ou devido a danos no SNC (dor neuropática) (MILLAN, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2004).

A nocicepção refere-se a manifestações neurofisiológicas, geradas por estímulos nocivos. Por outro lado, a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e requer a capacidade de abstração e elaboração do impulso sensorial (MELZACK e LOESER, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2004).

Com relação ao tempo de duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. É considerada aguda a dor que surge repentinamente, que tem duração limitada e que desaparece com a resolução do processo patológico. A dor crônica persiste por um extenso período de tempo, sendo associada à processos patológicos crônicos e alteração na transmissão neuronal (ALMEIDA *et al.*, 2004). Usualmente, o processo inflamatório está relacionado aos mecanismos que envolvem a nocicepção (LEVINE e REICHLING, 1999).

A inflamação é uma resposta desencadeada por lesões teciduais, traumas e por agentes infecciosos, com a finalidade de eliminar microorganismos ou outros agentes nocivos e potencializar o reparo tecidual (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY,

2004). Neste contexto, a inflamação também pode ser classificada como aguda e crônica de acordo com o tempo de duração e características patológicas (FANTONE e WARD, 1990; ROCHA e SILVA, 1978; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). A inflamação aguda apresenta curta duração (horas a meses). Durante este processo, mediadores como o óxido nítrico (NO) e as prostaglandinas (PGI₂; PGD₂; PGE₂; PGF₂α) promovem vasodilatação, um dos sinais característicos do processo inflamatório agudo, representado pelo calor e rubor da reação inflamatória (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

Outro sinal é a formação do edema, que ocorre devido ao fluxo transvascular de plasma dos compartimentos intravasculares para o interstício devido ao aumento de permeabilidade vascular de capilares e vênulas, como resultado da liberação de histamina, bradicinina, quimiocinas (IL-8), leucotrienos, fatores do complemento (C3a e C5a), substância P e fator de agregação plaquetária (PAF) no sítio inflamatório e ainda produtos bacterianos como peptídeos N- formilados, que promovem a quimiotaxia de leucócitos e de outras células fagocíticas para o sítio da reação inflamatória (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; ADEREM e SMITH, 2004).

O processo de inflamação aguda pode finalizar com a resolução de todos os eventos característicos da reação inflamatória e retorno do tecido lesionado à normalidade ou sua substituição por tecido conjuntivo (GILROY *et al.*, 2004; ADEREM e SMITH, 2004). A progressão da resposta tecidual para inflamação crônica caracteriza-se por infiltração de células mononucleares (macrófagos, linfócitos e plasmócitos). A inflamação crônica apresenta duração prolongada, onde ocorre de forma simultânea o processo inflamatório ativo, tentativas de reparo tecidual, com conseqüente destruição do tecido, e formação de fibrose. Entre as doenças crônicas inflamatórias incluem-se desordens como, por exemplo, aterosclerose e lupus eritematoso sistêmico entre outros (GILROY *et al.*, 2004; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004; SOMMER e KRESS, 2004).

O processo inflamatório resulta da liberação de diversos mediadores, alguns deles podendo sensibilizar os nociceptores locais das fibras aferentes periféricas C e Aδ. Contribuindo em parte para o desenvolvimento da dor de

origem inflamatória, bem como aumento e/ou expressão de determinadas moléculas como receptores, neurotransmissores, canais iônicos e enzimas (COUTAUX *et al.*, 2005). Os nociceptores correspondem às terminações nervosas livres e representam a parte distal dos neurônios aferentes de primeira ordem (A δ , C) (JULIUS e BASBAUM, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2004).

As fibras aferentes primárias A δ , são fibras levemente mielinizadas, de médio diâmetro que medeiam a dor aguda e passageira que aparece imediatamente após a lesão tecidual (primeira dor). As fibras C, não mielinizadas de pequeno diâmetro, medeiam a “segunda” dor, uma dor latente e difusa, que se prolonga por mais tempo (JULIUS e BASBAUM, 2001; CRAIG, 2003). Estas fibras são conhecidas como nociceptores polimodais C (PMN), devido a que respondem a estímulos nocivos térmicos, mecânicos e químicos. Ambas são classificadas em subtipos A δ 1, A δ 2, C1 e C2. (HUNT e MANTYH, 2001; IKEDA *et al.*, 2001; ALMEIDA *et al.*, 2004; COUTAUX *et al.*, 2005).

Entretanto, os neurônios sensoriais, de grande diâmetro, localizados na raiz do gânglio dorsal, dão origem às fibras mielinizadas, de rápida condução, denominadas fibras primárias aferentes A β . Estas fibras detectam estímulos inócuos aplicados sobre a pele e músculos, normalmente não contribuindo para condução da dor (MILLAN, 1999). Neste contexto, os neurônios aferentes primários podem ser ativados por uma série de mediadores, liberados no tecido lesado.

Estes mediadores promovem a despolarização das fibras aferentes primárias A δ e C que irão conduzir o impulso doloroso, para o corno dorsal da medula espinhal, particularmente até suas lâminas mais superficiais (lâminas I e II) e para as lâminas profundas (V e VI); como também para a lâmina circuncanular (lamina X). Por outro lado, as fibras A β , transmitem a informação de estímulos mecânicos inócuos para a lâmina profunda (IIIV) (HUNT e MANTYH, 2001; MILLAN, 1999; CRAIG, 2003).

Os feixes ascendentes que se formam devido à interação de neurônios de primeira ordem com neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal dão origem a diferentes vias ascendentes que didaticamente podem ser

classificadas em dois grupos: monossinápticas e polissinápticas (MILLAN, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2004).

As vias monossinápticas projetam-se a estruturas cerebrais superiores e incluem os feixes: espinotalâmico, espinoreticular, espinomencefálico, espinoparabraquio-amigdalóide, espinoparabraquio-hipotalâmico, espinohipotalâmico e neoespinotalâmico. O sistema polissináptico apresenta uma estação de retransmissão a neurônios de segunda ordem que conduzem a informação nociceptiva aos centros cerebrais, e consistem nos feixes paleoespinotalâmico, espinocervical e coluna dorsal polissináptica (MILLAN, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2004).

No tálamo, neurônios de terceira ordem projetam seus axônios ao córtex somatosensorial até o giro pós-central, onde a somatização do estímulo nocivo ocorre, ou emitem axônios ao giro anterior do cíngulo, vinculado a interpretação emocional da dor (RUSSO e BROSE, 1998). As vias descendentes originam-se no tronco cerebral, hipotálamo, tálamo, córtex, substância cinzenta periaquedutal (PAG), núcleo magno da rafe (NRM) e estruturas adjacentes da medula rostroventromedial (RVM), que exercem um relevante papel na integração e modulação das mensagens nociceptivas no corno dorsal (VANEGAS e SCHAIBLE, 2001).

Observando os mecanismos envolvidos na transmissão do processo doloroso descrito acima, pode-se afirmar que a dor não é uma sensação uniforme, o início das respostas de proteção são determinados por numerosos fatores dentro da medula espinhal e estruturas cerebrais, que participam na integração e modificação da resposta nociceptiva (DICKENSON, 1997).

Contudo, é importante destacar que tanto na dor clínica quanto na dor induzida em modelos experimentais, não há um mediador ou uma via (ascendente ou descendente) preponderante que contribua para a condução e perpetuação do estímulo nociceptivo. Dependendo do local, tipo, duração do estímulo e componentes emocionais, ocorre a ativação de diversos canais sensoriais, que irão convergir e interagir com estruturas supraespinhais, promovendo a sensação geral de dor (MILLAN, 1999).

Justificativa: A procura por constituintes bioativos de plantas superiores apresenta como possibilidade a descoberta de compostos que atuam em processos inflamatórios acompanhados de dor. O uso de extratos padronizados e de ação comprovada proporcionaria a descoberta de novos compostos de interesse terapêutico ou de protótipos que possibilitariam a síntese de moléculas com potencial interesse pelas indústrias farmacêuticas como por exemplo, a salicina, isolada da casca do salgueiro, servindo posteriormente como precursora na síntese do ácido salicílico, entre outras.

Nesse sentido, o presente estudo se justifica tendo em vista que estudos prévios sugerem que extratos ricos em antocianos apresentam atividade antinociceptiva, justificando a utilização popular de frutas vermelhas para o tratamento de certas doenças como a gota e artrites. Contudo estudos adicionais são necessários para confirmar a importante atividade antinociceptiva de *Vaccinium ashei* bem como para analisar os possíveis mecanismos de ação responsáveis pelo seu efeito antinociceptivo.

Face ao exposto o presente trabalho teve como objetivo testar o extrato de mirtilo, nos modelos de nocicepção química (formalina sub-plantar e contorções abdominais) e térmica (placa quente e tail-flick).

7.1 Phytochemical Study of the Fruits of Vaccinium Ashei and The Evaluation of the Antinociceptive Activity of the Extract.

A ser submetido à revista Química Nova (em preparação)

Phytochemical Study of the Fruits of *Vaccinium Ashei* and the Evaluation of the Antinociceptive Activity of the Extract.

Maria Rosana Ramirez e Amélia Teresinha Henriques

Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga 2752, Porto Alegre, RS.

Leandra Guterres, Odila Eli Dickel, Ana Luisa Muccillo Baisch e Daniela Marti Barros*

Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Av. Itália Km 8, Rio Grande, RS, Brazil.

Abstract

The present paper describes the phytochemical investigation and biological activities of the extracts of *Vaccinium Ashei*. The extract (doses 3.2; 6.4 mg/kg) were screened for its anti-nociceptive property using both chemical (acetic acid and formaldehyde tests) and thermal methods (hot-plate and tail-flick tests) of nociception in mice. The highest total phenolic content corresponded to the most potent degree of inhibition and the flavonoids were supposed to be the main species responsible for the activity. These findings suggest that the extract of *V. ashei* contain bioactive constituents with antinociceptive activities, by central and peripheral mechanism(s).

Key words: *Vaccinium ashei*, flavonoids, antinociceptive.

* barrosdm@yahoo.com.br

INTRODUCTION

Epidemiological studies have revealed the important role that foodstuffs of plant origin have to play in the prevention of many illnesses. The natural antioxidants present in such foodstuffs, among which the polyphenols are widely present, may be responsible for such an activity. Berries are an important dietary source of polyphenols, in particular anthocyanins and flavonols^{1,2}.

Anthocyanins, a flavonoid subclass, are predominantly associated with red berries but have also been found in vegetables, roots, and legumes. Owing to scientific research they have become not only food products but also therapeutic agents. Anthocyanin dyes affect the course of inflammatory process, as they are inhibitors of cyclooxygenase. They inhibit degranulation of mast cells and decrease the level of IL-2, INF- γ and TNF- α a mediator of inflammatory and nerve injury pain³. Cyanidin, the aglycone form of anthocyanins, exhibited similar inhibitory activity to non-steroidal anti-inflammatory agents, naproxen and ibuprofen⁴.

Other flavonols found in berries, such as quercitrin, hyperoside and rutin, have been shown to inhibit cyclooxygenase and lipoxygenase activities; both enzymes are involved in the release of arachidonic acid, the initiator of a general inflammatory response. Similarly, hydroxycinnamic acids from blueberry protect endothelial cells against TNF α induced inflammatory responses, and microscopic examinations demonstrated a positive effect of proanthocyanins in patients with pancreatitis, they slowed down pathologic changes of the organ and alleviated clinical symptoms (abdominal pain, nausea, vomiting)⁵.

As for other polyphenols, data obtained from *in vivo* experiments show that Chlorogenic acid presents anti-edematogenic and antinociceptive activities in animal models. Such activities may be attributed to the inhibitory action in the peripheral synthesis/release of inflammatory mediators involved in these responses, such as TNF α and NO⁵.

In this article, we describe a study in which the antinociceptive action of *Vaccinium ashei* extract was assayed in different experimental models of nociception in mice. This animal model offers a distinct advantage because it affords the opportunity to test new

substances under controlled conditions and eliminate the influence of comorbidities, drug therapy, and unwanted environmental variables, which can complicate data interpretation ⁶.

Additional experiments were conducted to determine the phenolic profile of *Vaccinium ashei* (rabbiteye blueberry), by high performance liquid chromatography (HPLC) coupled with photodiode array detection. Preliminary findings have been previously presented in abstract form ⁷.

EXPERIMENTAL

Animals

Male Swiss albino mice (25-30 g), from the Animal House of Fundação Universidade Federal do Rio Grande (FURG), were used in the present investigation. The animals were housed in temperature controlled rooms (20-22°C), under a 12-h light/dark cycle (light on at 0700 h) and 55% ± 1% relative humidity. Standard rodent diet and tap water were provided *ad libitum*. The experiments were performed according to the *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals* by the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1991), São Paulo, Brazil. In all experiments, there were 10 mice per group. The animals were placed in transparent glass observation chambers during the tests.

Preparation of lyophilized fruit extract and anthocyanin quantification

Representative samples of *Vaccinium ashei* Reade berries were collected at random from the following cultivars: *Woodard*, *Delite*, *Climax*, *Briteblue*, *Bluegen*, *Bluebelle*, *Aliceblue* and *Florida* (all originally American). Plants were produced by EMBRAPA DE CLIMA TEMPERADO, Pelotas, RS, Brazil, and kept at 0.5 - 0°C. Pesticide analysis was previously carried out and no sign of these substances was found, assuring no interference of pesticides on our results.

A mixture of fresh berries from the cultivars and selections described above were triturated mechanically and later lyophilized and kept sheltered from light. Anthocyanins were isolated following the procedure described in the European Pharmacopoeia⁸.

For the experiments, lyophilized berries were homogenized in 96% ethanol, agitated for 30 min and centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The supernatants were filtered through

filter paper and concentrated by rotary evaporation at 30°C. After rehydrophilization, extracts were stored until the time of administration to the animals, when they were redissolved in distilled water. These ethanol extracts contained 999 mg of anthocyanins per 100 gram, and this value was used for dosage calculation. The daily quantity of extract offered to the animals was calculated to provide 3.2 or 6.4 mg/kg/day of anthocyanins. During the whole procedure, including at the time of administration, the extract was kept sheltered from light².

Analytical methods

Identification and quantification of each compound was based on retention time and UV spectra in HPLC-DAD (Waters 2690), by comparison with pure commercial standards of known concentrations, using a Symmetry C₁₈ reverse-phase column (Waters). Gradient of mobile phase (A) water 0.1% TFA, (B) acetonitrile 0.1% TFA with a flow rate of 0.7 mL/min, column temperature, 26° C. Linear gradient, initial percentage of B (15%) to 50 minutes (100%); 10 µL injection. The spectra were recorded from 230 to 600 nm. Standard solution, was injected separately under directed HPLC conditions.

Experimental design

Animals were acclimatized to the laboratory environment and to the investigator who handled them, and they were divided into the groups of 10 animals with similar mean body weights. Mice were divided into a control group and a groups treated with *Vaccinium* berries extract. The extract was administered orally by gavage at doses of, 3.2 and 6.4 mg/kg/day of anthocyanins for 21 days (chronic model), and 60 min (acute model) prior test in all cases. During the experimental period, behavioral procedures (Writhing test, Hot plate test, Formalin-induced, Tail-flick assay), were performed as described below.

Drugs

Morphine (Dinomorf®) was obtained at the university hospital. Diclofenac (Cataflan®) was obtained from commercial sources in the city of Rio Grande, RS. Formaldehyde and acetic acid were purchased from Delaware® (Porto Alegre, RS, Brazil). The drugs were dispersed or dissolved in distilled water for administration.

Antinociceptive tests

Formalin-induced pain in mice

For the formalin test, diclofenac 5 mg/Kg and 20 μ l of 2.5% formaldehyde was injected into the left hind paw of the mice 30 min after they had received their respective treatments⁹. We recorded the amount that each animal spent licking the paw during two 5 min intervals: the first beginning immediately after injection (first phase) and the second 20 min after injection (second phase).

Writhing test

For the writhing test, mice received a 0.6% acetic acid injection (0.1 ml/kg, i.p.) 30 min after receiving their respective treatments. We recorded the number of contractions that occurred over 25 min starting 5 min after the acetic acid injection¹⁰.

Hot plate test

The hot-plate test was used to measure response latency according to the method described previously by Eddy and Leimbach¹¹, with minor modifications. In the current experiments, mice were placed individually on a hot plate (Insight®, Brazil) maintained at 54°C \pm 1°C before receiving their pre-treatments. We recorded the time that elapsed until the animal jumped or licked one of its hind paws (latency time in seconds); this time was considered to be the reaction time. Mice showing a pretreatment reaction time greater than 12 s were not used in the subsequent test. A cutoff time of 30 s was imposed to avoid tissue damage. Reaction times were again measured in mice in the five groups 30, 60, 90, 120, and 150 min after pre-treatment.

Tail-flick assay

The antinociceptive effect of the aqueous extract of *V. ashei* berry was also evaluated based on the measurement of the latency time of the avoidance response elicited when pain was induced by applying radiant heat to the animal's tail¹². Time to mouse tail flick was measured using a Letica tail-flick unit (Barcelona, Spain). Latency time was recorded before and 30, 60, 90, 120, and 150 min after pre-treatment with *V.ashei* extract,

distilled water, or morphine. A maximum latency time of 30 s was imposed to avoid tissue damage.

Statistical analysis

The results are expressed as mean \pm SEM. Comparison between groups was made by ANOVA followed by the Dunnett tests. Differences with $p < .05$ between experimental groups were considered statistically significant.

RESULTS AND DISCUSSION

Phytochemical study

Chlorogenic acid, was the main phenolic acid in the extracts. The qualitative composition of berry flavonoids was similar for all cultivars and 3 flavonoids were identified in all types of cultivars analyzed: quercitrin, hyperoside, isoquercitrin. Anthocyanidins found consisted of delphinidin, cyanidin, petunidin, peonidin, and malvidin attached with galactose, glucose, or arabinose at the C-3 position.

Antinociceptive activity

Analgesic curative options have found to be moderately effective, and their use is usually associated with severe side-effects that impede their constant use¹. The interest in finding complementary and new alternatives to treat persistent and chronic pain has increased considerably in the last time¹³, dietary constituents, such a poliphenols seem to represent good choices for this purpose.

The antinociceptive effect of the *V. ashei* extract was elicited regardless of which noxious stimulus was used: chemical agents (acetic acid and formaldehyde tests) or heat (hot-plate and tail-flick tests). Acetic acid acts indirectly by inducing the release of endogenous mediators that stimulate the nociceptive neurons that are sensitive to nonsteroidal antiinflammatory drugs and opioids. The model is not specific as it does not indicate whether the activity was central and/or peripheral¹⁴. *V. ashei* extract was effective in suppressing the acetic ac. induced abdominal constriction, the magnitude of action of

extract was similar for both doses (table 3 and 4). The analgesic effect of the *V. ashei* may therefore be due either to its action on visceral receptors sensitive to acetic acid, to the inhibition of the production of algogenic substances or the inhibition at the central level of the transmission of painful messages.

The formalin model is an important tool in assessing the analgesic properties of drug candidates. The injection of formalin in the rodents paw induces a biphasic response, the first phase initiates immediately after injection, being characterized by C-fiber activation due to peripheral stimuli⁴. The second phase is persistent period caused by local tissue inflammation and by functional changes in the dorsal horn of the spinal cord. Both phases are sensitive to centrally acting drugs such as opioids¹⁴, but the second phase is also sensitive to nonsteroidal anti-inflammatory drugs and corticosteroids. Suppression of second phase of the formalin test lends strong evidence to the presence of peripherally mediated effects⁵. Table 1-2 shows that *Vaccinium ashei* extract, in a dose and time-dependent fashion, inhibits the number of flinches during the second but not the first phase of the formalin test, and this effect its comparable to sodium diclofenac-treatment.

Anthocyanin are inhibitors of cyclooxygenase and apart from antioxidative activity, they inhibit degranulation of mast cells and decrease the level of TNF- α . Reports from other laboratories⁴ have demonstrated that TNF- α , among other inflammatory mediators, contributes to formalin-induced orofacial nociception, and is the first cytokine detected in inflammatory sites. Since, increased TNF- α levels are present as early as 25 min after inflammatory stimulus. In accordance, another report showed that TNF- α is a mediator of inflammatory and nerve injury pain. In view of that, it is possible that *Vaccinium ashei* extract inhibits the flinching behavior of the second phase of formalin test by inhibiting the synthesis of TNF- α . Results similar to ours have been reported for other phenolic compounds found in *V. ashei*, including quercetin, and some chlorogenic acid¹⁵.

Tail flick and hot plate tests are based on a phasic stimulus of high intensity, the hot-plate test is commonly used to assess narcotic analgesics or other centrally acting drugs however, are insensitive to nonsteroidal analgesics like cyclooxygenase inhibitors¹⁶. The ability of the extract of *Vaccinium ashei* to prolong the reaction latency to pain thermally-induced in mice by the hot plate further suggests central analgesic activity.

Thus, the tail-flick model is more sensitive for assessing the effectiveness of centrally acting analgesics¹⁷. Data regarding antinociceptive effects suggest that *V. ashei* extract at a dose of 6.4 mg/kg has a central analgesic effect, as evidenced by the prolonged delay in response when animal were subjected to a nociceptive stimulus in this model (table 7-8). These findings also suggest that *V. ashei* berries can have effects in opioid receptors.

The coexistence of analgesic and anti-inflammatory activities is defined for several non-steroidal anti-inflammatory drugs, particularly salicylates and their congeners⁴, the therapeutic effects derive from their ability to inhibit prostaglandin G/H synthase⁵. Prostaglandins are known to cause pain and non-steroidal anti-inflammatory drugs are effective when inflammation has caused sensitization of pain receptors to normally painless mechanical or chemical stimuli¹⁴.

It is of interest therefore, that the *V. ashei* behaved similar to the non-steroidal anti-inflammatory drugs in this work. Analgesic and anti-inflammatory effects have been observed in polyphenols¹⁸. Blueberry extract and certain flavonoids, possess potent inhibitory activity against a wide array of enzymes such as protein kinase C, protein tyrosine kinases, mitogen-activated protein kinase signaling, phospholipase A2, phosphodiesterases and others which have been widely shown to be important in painful process¹⁹. Alterations in these signaling pathways, should be studied as possible mechanisms for the effects we have found.

Conclusion: *Vaccinium ashei* extract contains various bioactive constituents such as anthocyanins, quercitrin, hyperoside, isoquercitrin, and chlorogenic acid. Those compounds of extract show anti-inflammatory effects and enhance the antioxidative capacity, since the nociceptive abilities of *V. Ashei* may be a collaboration of multicomponents in the extract. Additional experiments are necessary in order to confirm these hypotheses and to clarify the true target for the anti-inflammatory and analgesic effects of *Vaccinium ashei* extract.

Acknowledgements: Work supported by, FAPERGS (Grant N°04/04989) and CNPq, Brazil.

REFERENCES

1. Ramirez, M. R.; Izquierdo, I. A.; Bassols-Raseira, M. C.; Zuanazzi, J. A.; Barros, D. M.; Henriques, A. T.; *Pharm. Res.* **2005**, *52*, 457; Barros, D. M.; Amaral, O. B.; Izquierdo, I. A.; Geracitano, L.; Bassols Raseira, M. C.; Henriques, A. T., Ramirez, M. R.; *Pharm. Biochem. Behav.* **2006**, *84*, 229.
2. Talhouk, R. S.; Karam, C.; Fostok, S.; El-Jouni, W.; Barbour, E. K.; *J. Medicinal Food.* **2007**, *10*, 10.
3. Wang, H.; Nair, M. G.; Strasburg, G. M.; Chang, Y. C.; Booren, A. M.; Gray, J. I.; *J. Nat. Prod.* **1999**, *62*, 802; Kowalczyk, E.; Krzesiński, P.; Kura, M.; Szmigiel, B.; Aszczyk, J.; *Pol. J. Pharmacol.* **2003**, *55*, 702.
4. Seeram, N. P.; Momin, R. A.; Nair, M. G.; Bourquin, L. D.; *Phytomedicine* **2001**, *8*, 362.
5. Banerjee, B.; Bagchi, D. *Digestion*, **2001**, *63*, 203; Lin, L.C.; Kuo, Y.C.; Chou, C.J.; *J. Nat. Prod.*, **2002**, *65*, 505; Middleton, E. Jr.; Kandaswami, C.; Theoharides, T.C.; *Pharmacol. Rev.*, **2000**, *52*, 673.
6. Miaskowski, C.; Taiwo, Y. O.; Levine, J. D. *Brain Res*, **1993**, *608*, 87. Witek-Janusek, L. *Nursing Outlook*, **2004**, *52*, 108,.
7. Ramirez, M. R.; Aboy, A. L.; Henriques, A. T.; Bassols, M. C. R. *Resumos da 31^a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química*, Águas de Lindóia, Brasil, 2008.
8. European Pharmacopoeia Portuguesa 7th ed., Lisboa, **2002**.
9. Hunskaar, S.; Hole, K.; *Pain* **1987**, *30*, 103.
10. Koster, R.; Anderson, M.; de Beer, E. J.; *Fed. Proc.* **1959**, *18*, 412.

11. Eddy, N. B.; Leimbach, D.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1953**, *107*, 385.
12. D'Amour, F. E.; Smith, D. L.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1941**, *72*, 74.
13. Mendell, J. R.; Sahenk, Z. N.; *Engl. J. Med.* **2003**, *348*, 1243.
14. Svensson, C. I.; Yaksh, T. L.; *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **2002**, *42*, 553.
15. dos Santos, M. D.; Almeida, M. C.; Peporine, L. N.; de Souza, G. E. P.; *Biol. Pharm. Bull.* **2006**, *29*, 2236.
16. Le Bars, D.; Gozariu, M.; Caden, S. W.; *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 597.
17. Dewey, W. L.; Harris, L. S.; Howes, J. F.; Nuite, J. A.; *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1970**, *175*, 435.
18. Azevedo, L. L.; Siani, A. C.; Almeida, B. F.; Sampaio, F.A. L.; Henriques, M. G. M. O.; da Silva, R. C. A.; *Quim. Nova* **2007**, *30*, 860.
19. Middleton, E. Jr.; *Adv. Exp. Med. Biol.* **1998**, *439*, 175; Joseph, J. A.; Shukitt-Hale, B., Casadesus, G.; *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 313S.

Table 1. Effect of single treatment of *Vaccinium ashei* extract on the formalin-induced pain test in mice.

Treatment (mg/Kg)	1st phase	% inhibition (0 – 5 min)	2nd phase	% inhibition (20 – 25 min)
Control	49.4 ± 7.8		48.2 ± 13.9	
Morphine (10)	12.4 ± 5.3*	75.5	2.9 ± 2.4*	93.9
Diclofenac (5)	29.1 ± 6.6	40.1	19.7 ± 10.6*	58.9
Extract (3,2)	38.6 ± 3.0	20.4	30.6 ± 10.6	36.2
Extract (6,4)	37.5 ± 7.6	23.4	13.2 ± 3.5*	72.5

Effect of single treatment with both dose of extract in the formalin test. Data are expressed as mean ± S.E.M. The extract was administered orally by gavagem (3.2 and 6.4 mg/kg, of anthocyanins) and formalin (20 µl 2.5%) was administered subplantarly. Inhibition is reported as percent compared to the control. * Difference from control (ANOVA/ Dunnet, $P < 0.05$), $n = 10$ per group.

Table 2. Effect of prolonged treatment of *Vaccinium ashei* extract on the formalin-induced pain test in mice.

Treatment (mg/Kg)	1st phase	% inhibition (0 – 5 min)	2nd phase	% inhibition (20 – 25 min)
Control	35.6 ± 7.3	–	18.2 ± 9.2	–
Morphine (10)	1.9 ± 1.1*	94.6	0.0 ± 0.0*	100
Diclofenac (5)	29.3 ± 7.5	17.4	8.0 ± 5.1*	56.2
Extract (3,2)	8.8 ± 4.4	47.2	2.6 ± 1.8*	85.7
Extract (6,4)	26.3 ± 7.1	26.1	2.1 ± 1.1*	88.5

Effect of chronic treatment with both dose of extract in the formalin test. Data are expressed as mean ± S.E.M.. The *Vaccinium* extract was administered orally by gavagem (3.2 and 6.4 mg/kg, of anthocyanins) and formalin (20 µl 2.5%) was administered subplantarly. Inhibition is reported as percent compared to the control. * Difference from control (ANOVA/ Dunnet, $P < 0.05$), $n = 10$ per group.

Table 3. Effect of single treatment of *Vaccinium ashei* extract on the abdominal constrictions induced in mice by acetic acid.

Treatment (mg/kg)	Number of constrictions	% inhibition
Control	72.10 ± 4.27	-
Morphine (10)	0.30 ± 0.30*	99.59
Extract (3.2)	52.10 ± 3.05*	27.74
Extract (6.4)	38.70 ± 4.07*	46.33

Effect of single treatment with both dose of extract on the abdominal constrictions induced in mice by acetic acid. Data are expressed as mean ± S.E.M. for the number of constrictions indicated in the table. The extract was administered orally by gavagem (3.2 and 6.4 mg/kg, of anthocyanins) and acetic acid (0.6%) was administered intraperitoneally. Inhibition is reported as percent compared to the control. * Difference from control (ANOVA/ Dunnet, $P < 0.05$), $n = 10$ per group.

Table 4. Effect of prolonged treatment of *Vaccinium ashei* extract on the abdominal constrictions induced in mice by acetic acid.

Treatment (mg/kg)	Number of constrictions	% inhibition
Control	81.2 ± 4.9	-
Morphine (10)	1.7 ± 0.7*	97,9
Extract (3.2)	58.8 ± 4.5*	27,5
Extract (6.4)	57.9 ± 2.7*	27,5

Effect of chronic treatment with both dose of extract on the abdominal constrictions induced in mice by acetic acid. Data are expressed as mean ± S.E.M. for the number of constrictions indicated in the table. The extract was administered orally by gavagem (3.2 and 6.4 mg/kg, of anthocyanins) and acetic acid (0.6%) was administered intraperitoneally. Inhibition is reported as percent compared to the control. * Difference from control (ANOVA/ Dunnet, $P < 0.05$), $n = 10$ per group.

Table 5. Antinociceptive effect of single treatment of *Vaccinium ashei* extract on heat-induced pain in mice (hot-plate).

Treatment (mg/kg)	Latency (min)					
	0	30	60	90	120	150
Control	5.8 ± 0.4	7.1 ± 1.3	6.7 ± 0.9	6.7 ± 0.7	5.4 ± 0.4	9.1 ± 1.9
Morphine (10)	4.4 ± 0.7	27.1 ± 1.7*	29.4 ± 0.6*	29.9 ± 0.1*	30.0 ± 0.0*	30.0 ± 0.0*
Diclofenac (5)	4.2 ± 0.4	4.6 ± 0.61	15.4 ± 2.4*	18.2 ± 3.6*	17.3 ± 3.5*	21.3 ± 3.3*
Extract (3.2)	4.5 ± 0.4	5.5 ± 0.4	10.6 ± 2.2	15.0 ± 1.5*	13.7 ± 1.8*	22.9 ± 2.3*
Extract (6.4)	4.8 ± 0.4	15.0 ± 1.6*	16.4 ± 2.2*	21.1 ± 2.2*	23.1 ± 2.0*	25.4 ± 1.8*

Mice were placed on the hot-plate at 0, 30, 60, 90, 120, and 150 min after treatment. Latency values are expressed as means ± SEM. The percentage of hot-plate latency increase from 0 min is in parentheses. $n = 10$ for all groups. * $p < .05$ versus control.

Table 6. Antinociceptive effect of prolonged treatment of *Vaccinium ashei* extract on heat-induced pain in mice (hot-plate).

Treatment (mg/kg)	Latency (min)					
	0	30	60	90	120	150
Control	7.4 ± 1.8	9.0 ± 2.5	7.9 ± 1.8	10.6 ± 2.6	9.4 ± 2.7	8.7 ± 2.2
Morphine (10)	6.1 ± 1.0	28.7 ± 1.3*	30.0 ± 0.0*	30.0 ± 0.0	30.0 ± 0.0*	30.0 ± 0.0*
Diclofenac (5)	9.5 ± 2.6	12.6 ± 3.0	16.9 ± 2.9*	20.6 ± 3.1*	20.9 ± 2.6*	20.40 ± 2.5*
Extract (3.2)	13.0 ± 3.0	26.2 ± 2.5*	26.4 ± 2.1*	26.5 ± 2.3*	30.0 ± 0.0*	27.67 ± 1.8*
Extract (6.4)	7.1 ± 1.4	19.0 ± 3.3*	23.7 ± 2.4*	24.0 ± 2.4*	26.6 ± 1.86*	26.9 ± 1.6*

Mice were placed on the hot-plate at 0, 30, 60, 90, 120, and 150 min after treatment. Latency values are expressed as means ± SEM. $n = 10$ for all groups. * $p < .05$ versus control.

Table 7. Antinociceptive effect of single treatment of *Vaccinium ashei* extract in tail-flick test.

Treatment (mg/kg)	Latency (min)					
	0	30	60	90	120	150
Control	8.4 ± 1.4	11.9 ± 2.3	12.8 ± 1.2	12.4 ± 0.8	13.1 ± 1.0	13.2 ± 1.4
Morphine (10)	8.8 ± 1.9	30.0 ± 0.0*	29.4 ± 0.6*	28.1 ± 1.4*	24.5 ± 2.7*	26.2 ± 2.6*
Diclofenac (5)	10.1 ± 2.2	21.6 ± 1.4*	24.8 ± 1.9*	22.6 ± 1.8*	22.90 ± 2.5*	25.3 ± 1.3*
Extract (6.4)	7.0 ± 0.7	23.4 ± 2.8*	23.8 ± 2.7*	24.7 ± 2.2*	26.90 ± 1.3*	26.4 ± 1.8*

Latency of the tail-flick response to a heat stimulus was measured at 0, 30, 60, 90, 120, and 150 min after treatment. Latency values are expressed as means ± SEM. $n = 10$ for each group. * $p < .05$ versus control.

Table 8. Antinociceptive effect of prolonged treatment of *Vaccinium ashei* extract in tail-flick test.

Treatment (mg/kg)	Latency (min)					
	0	30	60	90	120	150
Control	7.5 ± 1.5	10.4 ± 1.7	10.9 ± 2.4	11.8 ± 2.4	12.0 ± 2.4	9.5 ± 0.9
Morphine (10)	6.4 ± 0.9	27.1 ± 1.7*	26.7 ± 1.1*	28.9 ± 0.7*	25.2 ± 1.6*	24.6 ± 2.0*
Diclofenac (5)	12.4 ± 2.9	11.7 ± 1.8	14.5 ± 2.1	17.0 ± 2.6	13.6 ± 1.72	14.0 ± 2.6
Extract (6.4)	16.4 ± 2.3*	20.4 ± 2.3*	20.1 ± 1.4*	20.5 ± 2.2*	20.1 ± 1.8*	18.5 ± 2.0*

Latency of the tail-flick response to a heat stimulus was measured at 0, 30, 60, 90, 120, and 150 min after treatment. Latency values are expressed as means ± SEM. $n = 10$ for each group. * $p < .05$ versus control.

8 CAPITULO IV

INTRODUÇÃO

A memória pode ser definida como a faculdade de reter conhecimentos e impressões, assim como conservar e evocar as informações adquiridas através de experiências vividas. A aprendizagem representa a aquisição de novas memórias (KANDEL, 2000).

Desde o ponto de vista evolutivo, a capacidade de adquirir novas informações é uma das mais importantes funções do SNC, e a expressão de memórias previamente adquiridas é crucial para a sobrevivência e evolução das espécies (MORGADO, 1999).

Neste contexto, os indivíduos apresentam capacidade de adaptação e modificação de seu comportamento quando expostos a novas experiências, e a capacidade de aprender e recordar eventos depende de modificações induzidas no SNC pela percepção desses eventos (RAMON y CAJAL, 1911; KANDEL, 2000).

Os aspectos relativos à memória humana foram estudados pela primeira vez por Ebbinghaus e as alterações da memória por Lorkoff (EICHENBAUM, 1993). EICHENBAUM (1997) foi particularmente influente e uma de suas grandes contribuições foi a de estabelecer o paradigma treino/teste para estudo da memória (SQUIRE e ZOLA-MORGAN, 1991). Esse paradigma demonstrou eficácia ao longo de diferentes estudos experimentais de memória, sendo parte desta dissertação embasada neste mesmo modelo.

Foram dessa época também as primeiras observações de que as estruturas do lobo temporal medial são fundamentais para certos tipos de memórias. A primeira dessas observações foi divulgada por Von Bechterew em 1990.

Em estudo de caso, Von Bechterew apresentou achados patológicos *post-mortem* de um cérebro de um homem que apresentou problemas de memória durante os últimos anos de sua vida. As alterações patológicas eram predominantes no lobo temporal medial, região do cérebro que incluía entre outras, o hipocampo, a amígdala e o córtex entorrinal. Outros relatos de casos ou experimentos com animais encontraram semelhante relação (BAXENDALE, 1998).

Em humanos, um dos relatos de casos, mais bem documentados e estudados, é do paciente conhecido como HM, o mesmo foi apresentado a comunidade internacional na década de 50 por Scoville e Milner.

O paciente HM apresentava memória limitada a eventos que antecederam uma cirurgia na qual parte dos lobos temporais foi retirada como o intuito de tratar uma epilepsia refrataria. Nesta cirurgia foram retiradas as amígdalas e o córtex entorrinal, assim como parte dos hipocampos, o que resultou em perda de memória recente deste indivíduo (BAXENDALE, 1998). Como este paciente retinha memórias remotas, ficou evidente que esta região é o sítio de processamento e armazenamento de informação assim como de formação de novas memórias (memórias de curta, STM e longa duração, LTM).

Evidências adicionais foram obtidas a partir de pacientes submetidos a Terapia Eletroconvulsiva (ECT). A ECT altera a função do hipocampo temporariamente, e estes pacientes sofrem amnésia e dificuldades com relação a novos aprendizados. A medida que passa o tempo as memórias se tornam acessíveis novamente.

Surgiu, portanto, a necessidade de se estabelecer os mecanismos celulares da memória. O fisiologista norte-americano William James (1890), foi um dos precursores no estudo das bases fisiológicas e as possíveis associações responsáveis pela formação de memória. No seu livro *Principles of psychology* ele propôs a “lei dos hábitos neurais” sugerindo que:

Quando dois processos cerebrais elementares são ativados conjuntamente ou em sucessão imediata, um deles, conseqüentemente, tende a propagar um impulso ao outro.

Esta frase representava a idéia de que a formação de associações no cérebro seria resultado da co-ativação de processos cerebrais, e conduziu ao conceito de que as sinapses seriam responsáveis pela gênese das memórias.

Dada a dificuldade de estudar a memória neste nível, os modelos animais que foram desenvolvidos por Pavlov e Thorndike representam até os dias de hoje um sistema eficaz para o seu estudo. Assim, com o desenvolvimento experimental nesta área, ficou claro que existem diferentes tipos de memórias e circuitos

cerebrais envolvidos nos processos de aquisição, consolidação e evocação das mesmas (de SOUZA, 2001).

Os diferentes tipos de memória foram classificados de forma didática a partir do fato de que as memórias podem ser declarativas ou explícitas ou então não declarativa ou procedurais. Conhecimento procedural, se refere a como realizar certas coisas, hábitos que é expresso em habilidades comportamentais (aquelas que não podem ser explicadas com palavras). Conhecimento declarativo permite explicar experiências prévias (com palavras). Isto requer processamento na região temporal medial, e tálamo e no caso das procedurais, no gânglio basal. Outros aspectos dependem da amígdala (memória emocional) e do cerebelo (aprendizado motor). Estes processos ocorrem por eventos bioquímicos que afetam fortemente os processos de sinapsis, produzem modificações estruturais dos neurônios, e alteram o número das mesmas (IZQUIERDO *et al.*, 1992).

Atualmente se conhece que o lóbulo temporal médio inclui o hipocampo e áreas adjacentes, responsáveis pela formação e da conversão de memórias de curta a longa duração. Desta forma, sabe-se que a região medial temporal é importante para a formação e a organização da memória, que as áreas corticais são responsáveis pelo armazenamento de eventos ocorridos e da maneira que são utilizados na dependência da situação enfrentada. Entretanto, existem muitas lacunas na compreensão deste processo, como por exemplo, as vias de processamento e armazenamento de informação (de SOUZA, 2001).

Algumas hipóteses atualmente tentam explicar como são formadas e mantidas as memórias no SNC. Autores propõem que a memória se mantém devido a um dispositivo que opera através de um circuito bioquímico de retorno (feedback) positivo, no qual a proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK), pode ativar uma proteína quinase C (PKC) (através de uma fosfolipase A₂). Também pode ocorrer de a PKC ativar a MAPK através da proteína quinase serina/treonina (RAF) e proteína MAP quinase quinase (MEK ou MAPKK), (SQUIRE e KANDEL, 1999).

Se as enzimas são fracamente ativadas por um estímulo externo a atividade de MAPK aumenta, mas retorna aos níveis basais após a remoção do

estímulo. Caso o estímulo seja forte, o circuito se mantém ativo (MAPK ativada) mesmo após a sua remoção. Como o biodispositivo é bioestável seria possível indicá-lo como um mecanismo de manutenção de memória (MICHEAU e RIEDEL, 1999).

Um outro dispositivo que envolve somente a proteína quinase dependente de cálcio e calmodulina (CAMKII), representa outro mecanismo de retroalimentação (feedback) proposto para o entendimento da manutenção da memória. Esta molécula pode ser ativada através do aumento da concentração intracelular de cálcio. Um dos substratos da enzima é ela mesma, que após sua autofosforilação modifica suas propriedades não necessitando mais de cálcio para se tornar ativa (MICHEAU e RIEDEL, 1999).

Para manter um circuito de retroalimentação positiva em funcionamento por vários anos (utilizado em memórias de longa duração) seriam necessários processos envolvendo mudanças na expressão gênica. Quando uma via neural é fortemente estimulada seria acionada a síntese de novas proteínas que resultaria no fortalecimento da resposta ao estímulo. Trabalhos envolvendo a fase tardia do processo da LTP (do inglês long term potentiation) são consistentes com essa hipótese (EICHENBAUM, 1993; 1997).

Um mecanismo proposto por alguns grupos é a participação do RNA_m na síntese protéica em sítios próximos às sinapses, promovendo a formação de segundos mensageiros que seriam responsáveis pelo constante estado ativado de uma via (MICHEAU *et al.*, 1999).

Os mecanismos de retroalimentação positiva não dependem de apenas um pequeno grupo de moléculas, no caso da degradação molecular outras moléculas podem ser formadas substituindo aquelas perdidas, permitindo, portanto um turnover dos elementos (proteínas principalmente) pós-sinápticos envolvidos na manutenção da memória (SHAPIRO e EICHENBAUM, 1999).

Obviamente, as hipóteses mencionadas sobre como as memórias são mantidas, e brevemente mencionadas aqui sofrem varias críticas, pois nem todas elas são aplicáveis a todos os tipos de processos de memória estudados.

Abordagem nutricional e avaliação cognitiva: Mente sã em um corpo são?

Como sabemos, a memória explícita é a primeira a ser afetada com o envelhecimento, e esta alteração parece estar relacionada ao aumento de processos inflamatórios e ao estresse oxidativo. Além disso, numerosos declínios cognitivos que ocorrem com a idade avançada podem ser manifestados por alteração no nível de neurotransmissores como, por exemplo: acetilcolina, noradrenalina, serotonina, dopamina. Essas aminas biogênicas são importantes nos mecanismos subjacentes às disfunções mentais e neurológicas como a depressão, a esquizofrenia, a dependência a drogas, a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer, entre outras (CANTUTI-CASTELVETRI *et al.*, 2000).

Entretanto, a escolha acertada de uma boa alimentação proporciona uma melhor performance física e mental, bem como ajuda a retardar o envelhecimento, entre outros benefícios. Alimentos que apresentem ingredientes fisiologicamente saudáveis fazem parte de uma gama de opções que podem ser incluídas na alimentação cotidiana, e que irão facilitar e até promover benefícios fisiológicos específicos no organismo. As frutas são alimentos que atendem bem a alguns desses requisitos já que são ricas em fitoquímicos, os quais não são considerados nutrientes já que a vida não depende deles. Os mecanismos de ação são tão diversos quanto os compostos: alguns atuam como antioxidantes, outros como inibidores de enzimas, entre outras propriedades. Contudo, o importante é que os fitoquímicos ajudam a promover a saúde e a prevenir doenças (CANTUTI-CASTELVETRI *et al.*, 2000).

A fruta de mirtilo é um excelente exemplo; em diversas investigações foi verificado que a suplementação com esta fruta reverte os efeitos deletérios causados pela idade e melhora a atividade locomotora em ratos velhos (JOSEPH *et al.*, 2005). Recentemente os mesmos autores demonstraram, num modelo animal para AD (camundongos transgênicos) que a suplementação com mirtilo melhora a função cognitiva nesses animais. Esses dados indicam que poderia ser possível controlar a predisposição genética para doença de Alzheimer através da dieta (JOSEPH *et al.*, 2003).

Na procura por alimentos mais saudáveis de uma maneira geral, o presente trabalho teve como objeto de estudo o mirtilo, principalmente por este ser um alimento pouco utilizado na dieta diária, visando propiciar alternativas de fácil acesso à sociedade e prevenção de doenças, e visando incluí-lo no rol dos alimentos funcionais.

Face ao exposto este capítulo está dividido em 3 partes:

Na primeira parte se apresentam os resultados correspondentes ao pré-tratamento por 30 dias com extrato de mirtilo, e após esse período os animais foram treinados e testados em diferentes tarefas comportamentais para:

- Avaliar o efeito sobre o aprendizado e memória em ratos adultos;
- Avaliar o efeito sobre a atividade locomotora, em ratos adultos;
- Avaliar o efeito ansiolítico em ratos adultos.

No segundo estudo, após treino, os animais foram tratados com o mesmo extrato para:

- Avaliar o efeito sobre o aprendizado e memória em camundongos adultos;
- Avaliar o efeito sobre a atividade locomotora, em camundongos adultos;
- Avaliar o efeito ansiolítico em camundongos adultos;
- Fazer a determinação do dano de DNA no córtex e no hipocampo dos camundongos.

Na terceira parte, ratos velhos e adultos também foram pré-tratados com o mesmo extrato e testados nas tarefas correspondentes para:

- Avaliar o efeito sobre o aprendizado e memória em ratos adultos e velhos;
- Avaliar o efeito sobre a atividade locomotora, em ratos adultos e velhos;
- Avaliar o efeito ansiolítico em ratos adultos e velhos;
- Avaliar o efeito sobre os níveis dos neurotransmissores dopamina, serotonina e seus metabólitos em hipocampo, córtex e estriado de ratos adultos e velhos.

8.1 *Effect of lyophilised Vaccinium berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats*

(Pharmacological Research, 2005)

8.2 *Behavioural and genoprotective effects of vaccinium berries intake in mice*

Pharmacology, Biochemistry and Behavior

(2006)

8.3 **Efeitos benéficos da suplementação com mirtilo no SNC: comparação entre ratos adultos e ratos velhos.**

3º Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul

Publicado no: Livro de memória do evento (2008)

Effect of lyophilised *Vaccinium* berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats

Maria Rosana Ramirez^{a,b,*}, Ivan Izquierdo^b, Maria do Carmo Bassols Raseira^d, José Ângelo Zuanazzi^a, Daniela Barros^c, Amélia Teresinha Henriques^a

^a Dep. Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Ipiranga, 2752, CEP 90610-000, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil

^d Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, EMBRAPA, Pelotas, RS, Brazil

Accepted 6 July 2005

Abstract

Epidemiological studies suggest that diets with a high intake of vegetables and fruits may reduce the incidence of degenerative disorders including Alzheimer's disease. Berries are some of the popular fruits consumed worldwide. They are considered to be rich in anthocyanin pigments, a group belonging to the flavonoids, a widespread class of phenolic compounds. Anthocyanins have notorious pharmacological properties, and have been used in humans for therapeutic purposes.

The present experiments were performed to study the possible effects of prolonged administration of lyophilised *Vaccinium* berries (blueberry, bilberry) on cognitive performance using step-down inhibitory avoidance, open field, elevated plus-maze, and radial maze tasks.

During this experiment the rats consumed approximately 3.2 mg kg⁻¹ day (oral), of the anthocyanins. The lyophilised berries were administered for 30 days before first training.

The present study showed that lyophilised berries significantly enhanced short-term memory, but not long-term memory in the inhibitory avoidance task, and induced an increase in the number of crossings in the first exposure to the open field. However, treated rats did not present any improvement of memory retention in open field habituation. Additionally, prolonged treatment with lyophilised berries did not have any significant effects in the elevated plus-maze task. Another interesting finding was that lyophilised berries improved working memory in the radial maze, with significant differences observed during sessions 1–2 and 4, but did not alter reference memory in this task. These results suggest that lyophilised berries may be beneficial in the prevention of memory deficits, one of the symptoms related to AD, and corroborate previous findings showing that flavonoids present effects in several learning paradigms.

© 2005 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Keywords: *Vaccinium*; Blueberry; Memory; Anxiety

1. Introduction

Scientific interest in compounds from plant secondary metabolism has increased, since epidemiological studies suggest that diets with a high intake of vegetables and fruits may reduce the incidence of some degenerative diseases [1].

Some fruits are rich in anthocyanin pigments, a group belonging to flavonoids, the widespread class of phenolic compounds. They are glycosides of polyhydroxy – and polymethoxy – derivatives of 2-phenylbenzopyrylium, or flavylium salts [2].

They are particularly abundant in red and purple berries and fruits as well as in red wines; thus, they play an important role in human and animal nutrition [3–5]. Depending on nutrition habits, the daily intake of anthocyanins in humans has been estimated to range from several milligrams to

* Corresponding author. Tel.: +55 51 33165243; fax: +55 51 33165437.
E-mail address: mariarosana@yahoo.com.br (M.R. Ramirez).

hundreds of milligrams [6]. Nonetheless, consumers might readily increase their daily anthocyanin intake as levels in some berries contain excess of 100 mg per 100 g [7]. Dietary consumption in some individuals has been estimated to be up to 200 mg/day, which is higher than for other flavonoids such as quercetin [8].

Likewise other flavonoids, the significance of anthocyanins has been discussed in relation to a wide range of physiological functions such as improvement of vision, anti-cancer activity, and also in their implication in neural dysfunction and cognitive decline. [1,4,9,10].

Joseph et al. [11] found that fruit extracts containing anthocyanins were effective in reversing age-related deficits in several neural and behavioral parameters, e.g. oxotremorine enhancement of a K^+ -evoked release of dopamine from striatal slices, carbachol-stimulated GTPase activity, striatal Ca^{2+} buffering in striatal synaptosomes, motor behavior on the rod walking and accelerating rota rod, and Morris water maze performance.

The present article examines the effect of lyophilised blueberries and bilberries (*Vaccinium*, *Ericaceae*) on memory, anxiety, and locomotion in adult rats.

2. Materials and methods

Berries of *Vaccinium* from several cultivars varieties (*Seleção 110*, *Brite blue*, *Wood ward*, *Florida*, *Climax*, *Bluegen*, *Delite*, *Seleção 77*, *Blue belle*, *Alice blue*). They were produced by EMBRAPA DE CLIMA TEMPERADO, Pelotas, RS, Brazil, and kept at -0.5 to 0°C . No sign of pesticides was reported, assuring no interference of these substances on the final results.

2.1. Preparation of lyophilised fruit

Fresh fruits were triturated mechanically and later lyophilised and kept sheltered from light. For the experiments, the lyophilised fruit were dissolved in water and administered to the rats.

2.2. Anthocyanin quantification

Anthocyanins were isolated with the procedure described in the European Pharmacopoeia (2002) [12]. Lyophilised berries contained 1.373 g% of anthocyanin, and this value was used for dosage calculation.

2.3. Subjects

The subjects were 20 adult male Wistar rats (aged 12 months), weighing 400–450 g, obtained from our own breeding colony. They were caged in groups of five with free access to food (standard certified rodent diet) and water, and were maintained on a 12-h-light/12-h-dark cycle (lights on at 07:00 h), at a temperature of $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Animals were ran-

domly assigned to each treatment group and all behavioral procedures took place between 08.00 a.m. and 14.30 p.m.

This study was approved by the Animal Care and Use Committee of our center (Universidade Federal de Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil). All efforts were made to reduce the number of animals used ($n = 20$) and their suffering.

2.4. Experimental design

Animals were acclimatised to the laboratory environment and to the investigator who handled them. They were divided into two groups of 10 animals with similar mean body weights.

Animals were divided into a control group which drank water ad libitum and a group which drank water supplemented with lyophilised berries during the experimental period ($n = 10/\text{group}$).

Food were available ad libitum, except during testing in the radial maze (RAM), when rats were fed approximately 15 g of laboratory chow following daily behavioral sessions to maintain weights at 85–90% of free-feeding body weight. Juice intake and weight were recorded daily.

2.5. Juice preparation

Lyophilised berries were suspended in water. The dose used was calculated to provide approximately $3.2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}$ of anthocyanins. The volume of juice provided was 30 ml/rat/day in all cases. Bottles were kept under light protection during the experimental period. Juice was administered for 30 days prior to training.

2.6. Behavioral procedures

A total of 20 male Wistar rats were used. They were submitted to the following behavioral tasks: (a) step-down inhibitory avoidance; (b) open field habituation; (c) elevated plus-maze; and (d) radial maze.

2.7. Inhibitory avoidance

The apparatus was a 50 cm \times 25 cm \times 25 cm acrylic box, whose floor consisted of parallel 1.0 mm diameter stainless steel bars spaced 1.0 cm apart. A 7.0 cm wide, 2.5 cm high, 25.0 cm long platform occupied the center floor. In the training session, immediately after stepping down placing their four paws on the grid the animals received a 0.4 mA, 2.0 s scrambled foot shock. In test sessions no foot shock was given and step-down latency was used as a measure of retention (to a ceiling of 180 s).

One-trial step-down inhibitory avoidance in rats involves the activation of two separate memory types, a short-term memory (STM) system, and a long-term memory (LTM) system. Therefore, retention tests were carried out 90 min after training to evaluate STM and 24 h and 7 days after training

to evaluate long-term memory [13–16]. The same rats were used for both tests, as testing for STM has been found not to affect LTM retention scores in previous studies [17–21].

2.8. Open field habituation

In order to control for possible effects of lyophilised berries on locomotor activity, animals were exposed twice, with a 24 h interval, to a 40 cm × 50 cm × 60 cm open field whose brown linoleum floor was divided into 12 equal squares by white lines. In both sessions, the animals were placed in the rear left square and left to explore it freely for 5 min [14,21], during which time the number of line crossings and rearings were counted.

2.9. Elevated plus-maze

Rats were also submitted to an elevated plus-maze, in order to determine if the lyophilised *Vaccinium* berries affect mobility, locomotion or anxiety-related behavior [14–22]. Briefly, the elevated plus-maze consisted of a central platform (5 cm × 5 cm), two open arms (50 cm × 10 cm × 50 cm), and two closed arms (50 cm × 10 cm × 40 cm). Arms were arranged in such a way that the two arms of each type were opposite to each other. The maze was 50 cm above floor level and tests were carried out under a dim red light. Animals were placed individually on the central platform of the plus-maze facing an open arm. Two observers recorded the number of rearings, the time spent in the open and enclosed arms and the number of entries in each arm during 5 min. The percentage of time spent in the enclosed arms and the number of entries in these arms were used as a measure of anxiety.

2.10. Radial-arm maze

Rats were tested on an eight-arm radial maze housed in a test room with a variety of visual cues, including pictures on the walls.

The eight-arm radial maze was made of wood and consisted of a central platform 45 cm in diameter, elevated 50 cm from the floor, with eight arms (10 cm × 68 cm) extending radially. Food cups for the reinforcers were located near the end of each arm (0.4 g). Animals were acclimated to the behavioral apparatus during at least two sessions, with each session consisting of 10 min free access to all arms.

The rats were initially trained for five sessions on the eight-arm radial maze. During each training session, rats were first placed on the central platform for 10 s with a bucket covering the arms. The bucket was removed and the rats were allowed to explore the maze. During training, all arms were baited with a half piece of standard certified rodent diet.

In the following sessions (14), four of the arms of the eight-arm radial maze described above were baited before each trial. The same arms were baited for all sessions. Rats

were then placed on the central platform and left free to explore the maze for 10 min. Arm choices were recorded when the rat placed all of its paws into the arm. Only one entry into an arm was rewarded. Re-entries into arms previously entered or into unbaited arms were counted as errors.

Working memory errors were recorded as the number of times the rat re-entered any of the four arms that were baited. Reference memory errors referred to the number of times the rat entered the four arms that were never baited. This included re-entries into the four arms. The experiment was stopped when all four pellets were eaten or when the time limit of 10 min was exceeded. Total food consumption and the time to eat all four were recorded. At the end of each phase, animals were removed from the maze and returned to their home cages.

2.11. Statistical analysis

The use of a 180 s ceiling in test sessions in the inhibitory avoidance task required non-parametric statistics to be used. Mann–Whitney *U*-test were employed as post hoc test for comparison with control group. Data for this task are expressed as median and interquartile intervals test-session latency. In all comparisons, $P < 0.05$ was considered to indicate statistical significance. For plus-maze and open-field habituation, data were analyzed by Student's *t*-test.

In the radial maze, working memory errors and reference memory errors, were analyzed separately using one between (groups: control or treated, to perform a first ANOVA from sessions 1 to 5, and a second one from days 7 to 14—excluding session 6), and one within (sessions) repeated measures analyses of variance (ANOVA).

Data for total time to run the maze were analyzed using Dunnett's test. Independent *t*-tests measurement was made between groups (control versus treated), in the different individual trials for each day of treatment. The cut-off for statistical significance was $P < 0.05$ in all cases.

3. Results

There were no differences in weight between the groups over time ($P > 0.05$) (data not shown). There were also no differences in water/juice intake between the groups over the course of the study ($P > 0.05$).

3.1. Step-down inhibitory avoidance task

The results are displayed in Fig. 1. Training session step-down latency differences among groups were not significant. The median (interquartile range) training step-down latencies for all animals ($n = 20$) was 4.3 (3.5/7.2).

In the test session, the treated group was different from the control group. The Mann–Whitney revealed a significant effect for STM ($U = 9$; $P < 0.040$). On the other hand, this

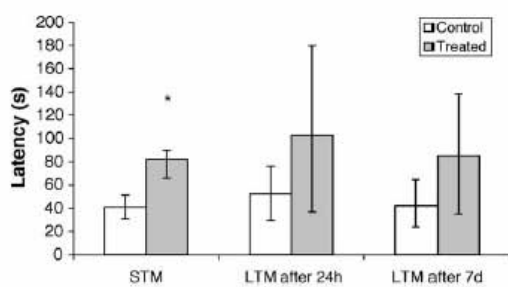


Fig. 1. Effect of the lyophilised berries of *Vaccinium* given 30 days prior training, in a step-down inhibitory avoidance task. Retention test latency measured 90 min (STM), 24 h and 7 days after training (LTM). Ordinates express median (interquartile range) test session latency, in seconds. Asterisk (*) indicates a significant difference in retention test performance from control group, in Mann–Whitney *U*-test ($n=10$ per group).

group showed a tendency to increase the retention of LTM, but this effect was not statistically significant.

3.2. Open field

The results are presented in Table 1. In the first session, the group treated with lyophilised *Vaccinium* berries was different when compared to the control group ($t_s=2.153$; $P<0.05$). Treatment with lyophilised berries induced an increase in the number of crossings in the open field in the first exposure, but not in the second session.

Both groups showed a decrease in the exploratory behavior in the second session (Controls: crossing, $t_s=2.62$; $P<0.05$; rearing $t_s=4.189$; Treated: crossing $t_s=6.563$; rearing $t_s=5.355$; $P<0.05$); demonstrating that habituation occurred in this task.

3.3. Elevated plus-maze

The results are presented in Table 2. In this test, the groups did not show statistical differences in this task. Treated rats

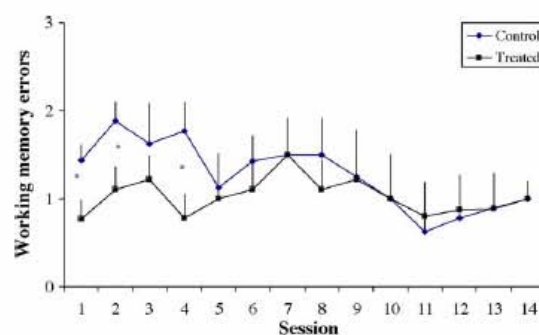


Fig. 2. Effect of the lyophilised berries of *Vaccinium* on the WM. Each point represents the mean \pm S.E.M. of each group for a single session. Asterisk (*) indicates difference in relation to control group ($P<0.05$), $n=10$ per group.

did not display changes in any of the parameters measured, indicating that in all probability their effects on STM and LTM are not due to interference with locomotion or anxiety levels.

3.4. Radial maze

Analysis of the first anova from sessions 1 to 5, showed significant choice accuracy improvement caused by lyophilised ($F=3.002$, $P<0.05$). During the 14 sessions, treated rats showed a decrease in working memory errors during sessions 1, 2 and 4 ($t_s=2.5$; $t_s=2.3$; $t_s=2.5$; $P<0.05$); with a significant improvement of choice accuracy. However, as shown in Fig. 2, this effect became attenuated and was not significant during the later sessions (from day 7 to 14). In contrast, no significant lyophilised effect was seen with reference errors (data not shown).

Total time to run the maze decreased in both groups during sessions 5–14 in comparison to the first day. However, there was no difference in time to run the maze between groups in all sessions (data not shown).

Table 1
Behavior of rats control and rats treated with lyophilised berries, in the open-field test

Group	First exposure		Second exposure	
	Crossing	Rearing	Crossing	Rearing
Control	29.48 \pm 3.67	16.35 \pm 1.91	17.94 \pm 1.41*	6.76 \pm 1.02*
Treated	39.73 \pm 3.05#	15.91 \pm 1.43	16.33 \pm 1.94**	7.25 \pm 0.81**

The data are expressed as mean \pm S.E.M.

* Difference between first and second exposure ($P<0.05$).

** Difference between first and second exposure ($P<0.05$).

Difference from control ($P<0.05$), $n=10$ per group.

Table 2
Behavior of rats treated with lyophilised berries of *Vaccinium*, and group control in the elevated plus-maze test

	Total entries	Entries open arms	Time open arms (%)	Rearing
Controls	4.27 \pm 0.58	4.44 \pm 1.09	82.00 \pm 0.60	9.11 \pm 1.69
Treated	4.29 \pm 0.58	3.25 \pm 0.61	78.40 \pm 0.75	8.50 \pm 0.67

Values are expressed as mean \pm S.E.M.

4. Discussion

Berries are some of the most popular fruits consumed worldwide. They are considered to be rich in anthocyanins. Anthocyanins have notorious pharmacological properties, and have been used by humans for therapeutic purposes [4]. In countries where berries are widely consumed, it is of fundamental interest to know whether or not this fruit might affect the neurological impairment caused either age-related cognitive and motor decline or neurological illness.

Reports from other laboratories have demonstrated that anthocyanins are found in plasma samples following a single orally administered dose, and therefore present oral bioavailability in rats [23–25]. As previously mentioned, the daily intake of anthocyanins in the USA has been estimated to be between 215 and 180 mg. For a human of 70 kg body weight, this corresponds to a daily consumption of 3.1 and 2.6 mg anthocyanins/kg, respectively [26]. During our experiment the rats consumed approximately $3.2 \text{ mg kg}^{-1} \text{ day}$, of the anthocyanins. Thus, the dietary intake of anthocyanins during this study is the same order of magnitude as that which occurs in humans.

Step-down inhibitory avoidance task is a classic task of memory with a strong aversive component [27]. Lyophilised berries exerted significant effects in short-term retention in these tasks according to Fig. 1. They also presented a trend to increase long-term retention of this task, but this effect was not statistically significant. However, since the time used in our study was relatively short, it is possible that higher rates of memory improvement might be found with longer periods of treatment.

We also examined the effect of lyophilised berries on the open-field test as it is presented in Table 1, which allowed us to study the effect of the treatment on the general locomotor activity of the animals [28]. Furthermore, this test allows evaluating habituation memory through measurement of the decrease in exploratory behavior (crossings and rearings) in the second session [29].

Our results found that animals treated with lyophilised berries had an increase in the number of crossings in the open field, in the first exposure. This may be related with peripheral effect upon locomotor activity, but did not seem to interfere with habituation to the open-field, as both groups (control and treated), presented a decrease in the exploratory behavior in the test session. These results of our experiments have been consistent with the favourable effect of anthocyanins on locomotor activity found in old animals [30].

The next experiment was to explore the possible anxiolytic effect of lyophilised berries. The elevated plus-maze test is the most useful test to search for anxiolytic agents [22,31], and several flavonoids were previously reported [32] to exhibit anxiolytic action in this tasks. However, lyophilised berries performed no effect on this task in our study as seen in Table 2.

Working memory, which is a memory system that is essential for a variety of cognitive tasks (language, problem solving, etc.), has been shown to deteriorate with ageing [33].

In follow-up studies [34], supplementation with blueberry extracts to aged rats was found to be effective in reversing certain age-related deficits in several behavioral parameters such as balance, coordination, working memory, and reference memory. Our results in the radial maze task corroborate these findings as presented in Fig. 2. Lyophilised berries improved working memory in sessions 1, 2 and 4, but did not affect reference memory. This seems to imply that the berries provide significant benefits in working memory during acquisition of the task.

The findings of the current study demonstrated a beneficial effect from lyophilised berries in rats, corroborating previous findings showing that phytochemicals, including anthocyanins presenting effects in several of learning paradigms [1].

In summary, the results also show that the memory enhancing effect of lyophilised was more pronounced for working and short-term memory than for other aspects of cognitive functioning. Since the understanding of the role of phytochemicals in memory function demands more complete knowledge of the interactions of these compounds with neurotransmitter systems in the brain, further studies will be necessary to elucidate the pharmacological basis of our results.

Acknowledgements

Work supported by, FAPERGS and CNPq, Brazil. This work is part of a cooperative program between the Fundação Universidade Federal do Rio Grande and Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil. We thank Miriam Apel for their technical help in the experiments.

References

- [1] Cantuti-Castelvetri I, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *Int J Dev Neurosci* 2000;18:367–81.
- [2] Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 2003;64:923–33.
- [3] Bagechi D, Sen CK, Bagechi M, Atalay M. Anti-angiogenic, antioxidant, and anti-carcinogenic properties of a novel anthocyanin-rich berry extract formula. *Biochemistry (Moscow)* 2004;69:75–80.
- [4] Hou D, Kai K, Li J, Lin S, Terahara N, Wakamatsu M, et al. Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure activity relationship and molecular mechanisms. *Carcinogenesis* 2004;25:9–36.
- [5] McAnulty SR, McAnulty LS, Nieman DC, Dumke CL, Morrow JD, Utter AC, et al. Consumption of blueberry polyphenols reduces exercise induced oxidative stress compared to vitamin C. *Nutr Res* 2004;24:209–21.
- [6] Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 1976;24:117–91.
- [7] McGhie TK, Ainge GD, Barnett LE, Cooney JM, Jensen DJ. Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *J Agric Food Chem* 2003;51:4539–48.

- [8] Scalbert A, Williamson G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. *J Nutr* 2000;130:073S–2085S.
- [9] Aruoma OI, Bahorun T, Jen L. Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutat Res* 2003;544:203–15.
- [10] Kowalczyk E, Krzesiński P, Kura M, Szmigiel B, Aszczyk J. Anthocyanins in medicine. *Pol J Pharmacol* 2003;55:699–702.
- [11] Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ, et al. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci* 1999;19:8114–21.
- [12] European Pharmacopeia Portuguesa. 7th ed. Lisboa; 2002 [CD-ROOM].
- [13] Bernabeu R, Bevilacqua L, Ardenghi P, Bromberg E, Schmitz P, Bianchin M, et al. Involvement of hippocampal D1/D5 receptor: cAMP signaling pathways in a late memory consolidation phase of an aversively-motivated task in rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:7041–6.
- [14] Barros DM, Izquierdo LA, Mello e Souza T, Ardenghi P, Pereira P, Medina JH, et al. Molecular signaling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial inhibitory avoidance learning in rats. *Behav Brain Res* 2000;114:183–92.
- [15] Barros DM, Mello e Souza T, de David T, Choi H, Aguzzoli A, Madche C, et al. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D1-noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behav Brain Res* 2001;124:1–7.
- [16] Barros DM, Pereira P, Medina JH, Izquierdo I. Modulation of working memory and of long- but not short-term memory by cholinergic mechanisms in the basolateral amygdala. *Behav Pharmacol* 2002;13:163–7.
- [17] Izquierdo I, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Izquierdo LA, Medina JH. Separate but linked mechanisms for short- and long-term memory in the rat. *Nature* 1998;393:635–6.
- [18] Izquierdo I, Medina JH, Izquierdo LA, Barros DM, de Souza MM, Mello e Souza T. Short- and long-term memory are differentially regulated by monoaminergic systems in the rat brain. *Neurobiol Learn Mem* 1998;69:219–24.
- [19] Izquierdo I, Izquierdo LA, Barros DM, Mello e Souza T, de Souza MM, Quevedo J, et al. Differential involvement of cortical receptor mechanisms in working, short- and long-term memory. *Behav Pharmacol* 1998;9:421–7.
- [20] Izquierdo LA, Barros DM, Ardenghi P, Pereira P, Rodrigues C, Choi H, et al. Different hippocampal molecular requirements for short- and long-term retrieval of one-trial avoidance learning. *Behav Brain Res* 2000;111:93–8.
- [21] Izquierdo LA, Barros DM, Vianna MRM, Coitinho AS, deDavid e Silva T, Choi H, et al. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell Mol Neurobiol* 2002;22:269–88.
- [22] Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Meth* 1985;14:149–76.
- [23] Tsuda T, Horio F, Osawa T. Absorption and metabolism of cyanidin 3-*O*-beta-D-glucoside in rats. *FEBS Lett* 1999;449:179–82.
- [24] Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J Agric Food Chem* 1999;47:1083–91.
- [25] Matsumoto H, Inaba H, Kishi M, Tominaga S, Hirayama M, Tsuda T. Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *J Agric Food Chem* 2001;49:1546–51.
- [26] Frank J, Kamal-Eldin A, Lundh T, Määttä K, Törrönen R, Vessby B. Effects of dietary anthocyanins on tocopherols and lipids in rats. *J Agric Food Chem* 2002;50:7226–30.
- [27] Cahill L, Brioni J, Izquierdo I. Retrograde memory enhancement by diazepam: its relation to anterograde amnesia and some clinical implications. *Psychopharmacology* 1986;90:454–6.
- [28] Novas ML, Wolfman C, Medina JH, De Robertis E. Proconvulsant and anxiogenic effects of *n*-butyl-b-carboline-3-carboxylate, on endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. *Pharmacol Biochem Behav* 1988;30:331–6.
- [29] Salgueiro JB, Ardenghi P, Dias M, Ferreira MBC, Izquierdo I, Medina JH. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;58:887–91.
- [30] Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Prior RL, Cao G, Martin A, et al. Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin e supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *J Neurosci* 1998;18:8047–55.
- [31] Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety on ethological perspective. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:289–304.
- [32] Marder M, Viola H, Wasowski C, Wolfman C, Waterman PG, Medina JH, et al. 6,3'-Dinitroflavone, a novel high affinity ligand for the benzodiazepine receptor with potent anxiolytic properties. *Bioor Med Chem Lett* 1995;5:2717–20.
- [33] Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods* 1984;11:47–60.
- [34] Youdim KA, Shukitt-Hale B, Martin A, Wang H, Denisova N, Bickford PC, et al. Short-term dietary supplementation of blueberry polyphenolics: beneficial effects on aging brain performance and peripheral tissue function. *Nutr Neurosci* 2000;3:383–97.

Behavioral and genoprotective effects of *Vaccinium* berries intake in mice

Daniela Barros ^{c,c}, Olavo B. Amaral ^{b,c}, Ivan Izquierdo ^c, Laura Geracitano ^c,
Maria do Carmo Bassols Raseira ^d, Amélia Teresinha Henriques ^a, Maria Rosana Ramirez ^{a,*}

^a Faculdade de Farmácia Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^b Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

^c Departamento de Ciências Fisiológicas, Fundação Universidade Federal de Rio Grande, Rio Grande, RS, Brazil

^d Centro de Pesquisa Agropecuária de Clima Temperado, EMBRAPA, Pelotas, RS, Brazil

^e Pontifícia Universidade Católica de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil

Received 4 November 2005; received in revised form 24 April 2006; accepted 5 May 2006

Available online 21 June 2006

Abstract

Studies have shown that supplementation with berries rich in anthocyanins are effective in reducing oxidative stress associated with aging, and are beneficial in reversing age-related neuronal and behavioral changes. However, there are few reports on other biological activities of these polyphenols, such as genoprotective effects. The present experiments were performed to study the possible effects of 30-day administration of a lyophilized extract of *Vaccinium ashei* berries on cognitive performance using step-down inhibitory avoidance, open-field habituation and elevated plus-maze tasks, as well as on DNA damage in the hippocampus and cerebral cortex. The present study showed that the extract significantly enhanced long-term memory in the inhibitory avoidance task, induced an increase in the number of crossings during open-field habituation and had an anxiolytic effect in the elevated plus-maze task. Moreover, the extract reduced oxidative DNA damage in brain tissue *in vitro*. These results suggest that supplementation with *V. ashei* berries to mice improves performance on memory tasks and has a protective effect on DNA damage, possibly due to the antioxidant activity of polyphenols, including anthocyanins.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

Keywords: *Vaccinium*; Anthocyanin; Memory; DNA damage

1. Introduction

Phenolic compounds are naturally occurring secondary metabolites from plants. They are present in fruits, vegetables, leaves, nuts, seeds, flowers and barks. These compounds are an integral part of the human diet and are also taken intentionally as medicinal preparations (Kuhnau, 1976; Kong et al., 2003). They act as inhibitors or activators for a large variety of mammalian enzyme systems, and as metal chelators and scavengers of free oxygen radicals (Sellappan et al., 2002; Ono et al., 2002). It has been suggested that free radical scavenging and antioxidant activities play an important role in the prevention of aging and disease-related free radical-induced damage (Joseph et al., 1998; Cantuti-Castelvetri et al., 2000; Youdim et al., 2000).

As with other fruits, blueberries and bilberries contain a range of micronutrients which are essential for health. In particular, many types of berries contain a high level of vitamin C (ascorbic acid), folic acid, resveratrol, pterostilbene and piceatannol (Rimando et al., 2004). However, berries may have additional health benefits as they are also rich in phytochemicals such as anthocyanins and flavonols (Prior et al., 1998; Sellappan et al., 2002; Beattie et al., 2005). It has been hypothesized that additive and synergistic effects of these complex mixtures of phytochemicals, instead of a single component, are responsible for the health benefits derived from fruits and vegetables (Aruoma et al., 2003).

The aim of this study was to carry out psychopharmacological screening to evaluate potential effects of a lyophilized extract of different cultivars from *Vaccinium ashei*, Reade (*Ericaceae*) berries, commonly known as rabbiteye blueberries, on memory, anxiety and locomotor performance, as well as on DNA damage in the hippocampus and cerebral cortex, which is

* Corresponding author. Tel.: +51 3316 5243; fax: +51 3316 5437.

E-mail address: cpgcf@farmacia.ufrgs.br (M.R. Ramirez).

thought to be a useful indicator of the bioavailability and efficacy of antioxidant supplements.

2. Materials and methods

2.1. Subjects

The subjects were 30 adult male Swiss mice (aged 3 months), weighing 35–45 g, obtained from our own breeding colony. They were caged in groups of five with free access to food (standard certified rodent diet) and water, and were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 h), at a temperature of 23 ± 1 °C. Animals were randomly assigned to each treatment group and all behavioural procedures took place between 8 am and 2 p.m.

The study was approved by the Animal Care and Use Committee of our center (Universidade Federal de Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil), and all efforts were made to reduce the number of animals used and their suffering.

3. Preparation of lyophilized fruit extract and anthocyanin quantification

Representative samples of *V. ashei* Reade berries were collected at random from the following cultivars: *Woodard*, *Delite*, *Climax*, *Briteblue*, *Bluegen*, *Bluebelle*, *Aliceblue* and *Florida* (all originally American). Two selections (110 and 77) from these cultivars, both obtained from seedlings coming from open pollination of *Bonita* cultivars, were also used in the mixture. Plants were produced by EMBRAPA DE CLIMA TEMPERADO, Pelotas, RS, Brazil, and kept at -0.5 to 0 °C. Pesticide analysis was previously carried out and no sign of these substances was found, assuring no interference of pesticides on our results.

A mixture of fresh berries from the cultivars and selections described above were triturated mechanically and later lyophilized and kept sheltered from light. Anthocyanins were isolated following the procedure described in the [European Pharmacopeia \(2002\)](#).

For the experiments, lyophilized berries were homogenized in 96% ethanol, agitated for 30 min and centrifuged at 3000 rpm for 15 min. The supernatants were filtered through filter paper and concentrated by rotary evaporation at 30 °C. After relyophilization, extracts were stored until the time of administration to the animals, when they were redissolved in distilled water. These ethanol extracts contained 999 mg of anthocyanins per 100 g, and this value was used for dosage calculation. The daily quantity of extract offered to the animals was calculated to provide either 0.6–1.0 or 2.6–3.2 mg/kg/day of anthocyanins. The volume of juice provided was 10 ml/mice/day in all cases. During the whole procedure, including at the time of administration, the extract was kept sheltered from light.

4. Experimental design

Animals were acclimatized to the laboratory environment and to the investigator who handled them. They underwent

training in an inhibitory avoidance task (described below) and were subsequently divided into a control group which drank water ad libitum and two groups which drank water supplemented with different concentrations of lyophilized *Vaccinium* berries extract for 30 days ($n=10$ animals/group), with group 1 receiving 0.6–1.0 mg/kg/day and group 2 receiving 2.6–3.2 mg/kg/day of anthocyanins. Food was available ad libitum. Juice intake and weight were recorded daily.

During the 30-day period, behavioral procedures (inhibitory avoidance testing, open-field habituation and elevated plus-maze) were performed as described below. At the end of this period, animals in the control group and in group 2 were sacrificed. Hippocampi and cerebral cortices were dissected and used to test DNA damage through an alkaline single cell electrophoresis (comet) assay.

5. Behavioral procedures

Animals were subjected to the following behavioral tasks: (a) step-down inhibitory avoidance, (b) open-field habituation and (c) elevated plus-maze.

5.1. Inhibitory avoidance

The inhibitory avoidance apparatus was a $50 \times 25 \times 25$ -cm acrylic box, whose floor consisted of parallel 1.0 mm diameter stainless steel bars spaced 1.0 cm apart. A 10-cm^2 , 2-cm high, platform occupied the center of the floor. In the training session, immediately after stepping down and placing their four paws on the grid, animals received a 0.4 mA, 2.0 s scrambled foot shock. In test sessions, no foot shock was used and step-down latency (with a ceiling of 180 s) was used as a measure of memory retention. Test sessions were carried out 24 h, 7 days and 30 days after training (Barros et al., 2000, 2001, 2002).

5.2. Open-field habituation

The open-field apparatus consisted of a 40×50 -cm wide arena whose brown linoleum floor was divided into 12 equal squares by white lines. In the first exploration session, animals were placed in the rear left square and left to explore the arena freely for a 5-min period (Barros et al., 2000), during which the number of line crossings and rearings were counted and used to measure locomotion and exploratory activity. Twenty-four hours later, animals were left to explore the apparatus again for another 5 min and the same measures were recorded to evaluate habituation to the task.

5.3. Elevated plus-maze

The elevated plus-maze consisted of a central platform (10×10 cm) with four 45×10 -cm arms, of which two were open and two were closed. Arms were arranged in such a way that the two arms of each type were opposite to each other. The maze was kept 88 cm above floor level and tests were carried out under dim red light. Animals were placed individually on

the central platform of the plus-maze facing an open arm. Two observers recorded the number of rearings, the time spent in the open and enclosed arms and the number of entries in each arm during 5 min. The percentage of time spent in the enclosed arms and the number of entries in these arms were used as a measure of anxiety (Barros et al., 2000; Izquierdo et al., 2002; Pellow et al., 1985).

5.4. Alkaline single cell electrophoresis (comet) assay

DNA damage was evaluated through the alkaline single cell electrophoresis (comet) assay, performed as described by Singh et al. (1988) and Tice et al. (2000), with some modifications. Hippocampi and cerebral cortices were dissected for five animals from the control group and five animals from group 2. Tissue was homogenated in 500 μ l of cold (4 °C) phosphate-buffered saline solution (PBS). For each sample, an aliquot (30 μ l) was diluted in PBS to a final volume of 100 μ l and another aliquot (30 μ l) was diluted in PBS plus H₂O₂ (1 mM) to a final volume of 100 μ l. The *in vitro* assay with H₂O₂ was performed on ice for 5 min (Psimadas et al., 2004). Finally, 10 μ l of these cellular suspensions were diluted in 80 μ l of low melting point agarose (0.65%) and added to fully frozen slides, which had been covered with a layer of 0.65% normal melting point agarose. Following layer solidification, cells in slides were lysed (2.5 M NaOH, 0.1 M EDTA, 0.01 M Tris, 1% sodium sarcocinate, 1% Triton X-100 and 10% dimethyl sulfoxide, pH 10) overnight at 4 °C. Subsequently, samples were placed in the electrophoresis solution (300 mM NaOH and 1 mM EDTA, pH 13) for 30 min to allow DNA unwinding. Electrophoresis was then performed during 35 min at 25 V and 280 mA. Finally, slides were neutralized with 0.4 M Tris buffer (pH 7.5), stained with 50 μ l of ethidium bromide (20 μ g/ml) and analyzed using a Zeiss-Axioplan epifluorescence microscope (400 \times magnification). In 100 randomly selected cells in duplicated slides, DNA damage was classified as undamaged (class 0) or as presenting short migration of DNA (class 1), medium migration (class 2), long migration (class 3) and complete migration (no nucleus remaining, class 4). The final score was calculated by adding the scores for each cell in the slide, resulting in a final score of 0 for no DNA damage and 400 for maximum damage.

5.5. Statistical analysis

Data for the inhibitory avoidance task are expressed as median and interquartile intervals for test session latencies. To evaluate differences among groups, a Kruskal–Wallis test was used, followed by Mann–Whitney's *U*-test when appropriate.

For the plus-maze and open-field habituation, data are expressed as mean and standard errors of mean, and groups were compared using one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Dunnett's test against the control group when appropriate. Intragroup comparisons among the two test sessions were performed using a paired samples *t*-test.

For alkaline single cell electrophoresis (comet) assay, data are expressed as mean and standard errors and analyzed with

one-way ANOVA. In all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

6. Results

There were no significant differences in weight between the groups over time ($p > 0.05$) (data not shown). There were also no differences in water/juice intake between the groups over the course of the study ($p > 0.05$).

6.1. Inhibitory avoidance

Results for the inhibitory avoidance task are displayed in Fig. 1. Groups treated with lyophilized fruit extract after training had higher memory retention in all test sessions, an effect which was statistically significant at 7 ($U = 23.5$, $p < 0.05$) and 30 days of supplementation ($U = 0.0$, $p < 0.05$) for group 1, and at 24 h ($U = 7$, $p < 0.05$), 7 days ($U = 4.0$, $p < 0.05$) and 30 days ($U = 3$, $p < 0.05$) for group 2. Training session step-down latency differences among groups were not significantly different among groups.

6.2. Open-field habituation

Results for open-field habituation are presented in Table 1. There was no significant difference in locomotor activity among the three groups in the first session ($p < 0.05$). In the second session, there was a decrease in exploration in the control group and in group 1 indicating habituation to the open-field environment ($F = 5.638$, $t = 2.34$, $p < 0.05$). This effect was not as clearly observed in group 2, in which there was no significant difference in the number of crossings among sessions. Moreover, this group had an increased number of crossings in the second session when compared to the control group and group 1 ($t = 3.61$, $p < 0.05$), an effect which could be due to increased locomotion or impaired habituation. There was also a

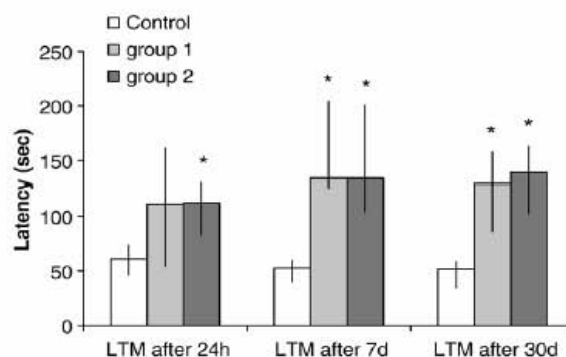


Fig. 1. Test latencies for the inhibitory avoidance task measured 24 h, 7 days and 30 days after training in controls, group 1 (0.6–1.0 mg/kg/day of anthocyanins) and group 2 (2.6–3.2 mg/kg/day). Data express median (interquartile range) test session latencies in seconds. Asterisks indicate significant differences in retention test performance from respective control groups (Mann–Whitney *U*-test, two-tailed, $p < 0.05$), $n = 10$ per group.

Table 1
Open-field habituation

	Crossings		Rearings	
	1st session	2nd session	1st session	2nd session
Controls	63.10±6.62	46.30±2.77 ^a	19.30±2.17	23.50±1.58
Group 1	61.70±3.81	49.40±3.30 ^a	17.40±2.04	20.30±1.97
Group 2	70.40±3.13	63.10±1.85 ^b	23.60±1.77	27.80±1.83

Effect of treatment with both dosages of *Vaccinium* lyophilized extract in the open-field habituation task. Data are expressed as mean±S.E.M. $n=10$ per group.

^a Indicates a significant difference between the first and second sessions.

^b Indicates a significant difference from the control group in the same session.

trend toward an increase in rearings in group 2, but this was not statistically significant.

6.3. Elevated plus-maze

Results are presented in Table 2. In this test, group 2 spent significantly more time in the open arms of the maze, suggesting an anxiolytic effect of the treatment. Group 2 also presented statistical differences in the number of entries in the open arms when compared to the control group ($F=5.638$, $t=2.53$, $p<0.05$).

6.4. Alkaline single cell electrophoresis (comet) assay

Treatment with lyophilized fruit extract significantly decreased the DNA damage in hippocampal tissues in comparison to the respective control groups as evaluated by the single cell electrophoresis (comet) assay (Fig. 2) ($p<0.05$). In the assay after *in vitro* treatment with H_2O_2 , similar scores were found among treated animals and controls. In the cerebral cortex (Fig. 3), similar results were found: DNA damage was decreased in the treated group ($p<0.05$) when compared to controls, whereas after H_2O_2 treatment no differences were found (data not shown).

7. Discussion

Recent studies have demonstrated that dietary supplementation with blueberry polyphenolics may have beneficial actions on motor and cognitive function, and that they may improve antioxidant status (Joseph et al., 2005). Berry extracts have high

Table 2
Elevated plus-maze

	Total entries	Entries open arms	%Time open arms	Rearings
Controls	11.60±1.55	8.10±1.50	20.0±0.25	15.1±1.57
Group 1	9.05±1.50	7.30±1.34	23.33±0.32	12.50±2.20
Group 2	14.60±1.51	14.10±2.10*	36.03±0.30*	15.10±2.51

Total number of entries, number of entries in open arms, percentage of time spent in open arms and rearings for the three study groups in the elevated plus-maze task. Values are expressed as mean±S.E.M.

$n=10$ per group.

* Difference in relation to control group ($p<0.05$).

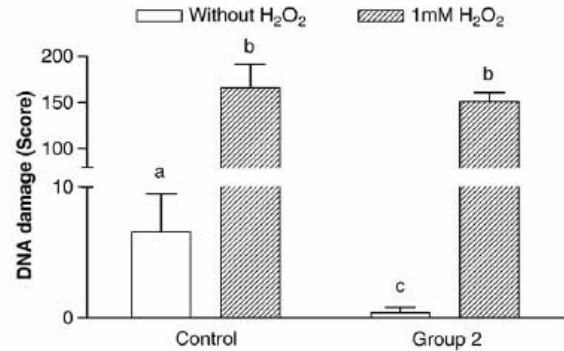


Fig. 2. Effect of the higher dose (2.6–3.2 mg/kg) of *Vaccinium* berries lyophilized extract on DNA damage evaluated by alkaline single cell electrophoresis (comet) assay in hippocampal tissue with (white) and without (striped) treatment with 1 mM of H_2O_2 . Values are mean±S.E.M. ($n=5$). Similar letters mean absence of statistical differences ($p>0.05$) between groups, while different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

antioxidant activity, and this activity correlates with their content of anthocyanins and total phenolic compounds (Prior et al., 1998; Sellappan et al., 2002; Ono et al., 2002; McAnulty et al., 2004).

A number of investigators have found that flavonoids, including some anthocyanins, possess oral bioavailability in rats (Tsuda et al., 1999; Miyazawa et al., 1999; Matsumoto et al., 2001; McGhie et al., 2003) and that they are able to cross the rat blood–brain barrier after blueberry (Andrés-Lacueva et al., 2005) and blackberry (Talavera et al., 2005) supplementation, as well as after a single administration (Youdim et al., 2003; Passamonti et al., 2005) suggesting that these compounds can feasibly have a direct effect on brain processes. Dietary consumption in some individuals has been estimated to be up to 200 mg/day of anthocyanins, which is higher than that of other flavonoids (23 mg/day) such as quercetin (Scalbert and Williamson, 2000; Frank et al., 2002; McGhie et al., 2003). During our experiment, animals ingested approximately 0.3–

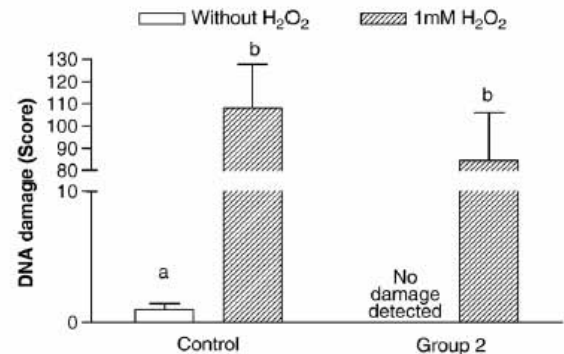


Fig. 3. Effect of the higher dose (2.6–3.2 mg/kg) of *Vaccinium* berries lyophilized extract on DNA damage evaluated by alkaline single cell electrophoresis (comet) assay in cortex tissue with (white) and without (striped) treatment with 1 mM of H_2O_2 . Values are mean±S.E.M. ($n=5$). Similar letters mean absence of statistical differences ($p>0.05$) between groups, while different letters indicate significant differences ($p<0.05$).

3.2 mg/kg/day of the anthocyanins; thus, their dietary intake was approximately of the same order of magnitude as that which occurs in humans.

In this work, the effects of extract from *V. ashei* were studied in several behavioral animal models. In the step-down inhibitory avoidance task, a classic model to evaluate memory with a strong aversive component (Cahill et al., 1986), the extract exerted significant effects in long-term retention of the task. Although our protocol does not allow us to tell if these effects occurred on memory consolidation or retrieval, a clear enhancement of retention was seen 7 and 30 days after training. Twenty-four hours after training, this was also observed for the higher dose (2.6–3.2 mg/kg), whereas a visible, albeit nonsignificant, trend towards enhancement was seen with the lower dose (0.3–0.6 mg/kg). This seems to indicate that extract is effective in a broad spectrum of dosage, confirming our expectation that the composition of the juice and the time of administration are more significant than the dosage used.

In the open-field test, which allows us to measure general locomotor activity as well as habituation to a new environment (Novas et al., 1988), animals treated with the higher dose of the extract showed an increase in the number of crossings in the second session of habituation. This could be due to an effect of the blueberry extract on motor behaviour, as has been found on other tasks such as the rod walking and accelerating rota rod tests (Joseph et al., 1998, 1999), or eventually to interference with habituation to the task, although the memory-enhancing effects observed in the inhibitory avoidance task argues against the latter possibility (Ramirez et al., 2005). Other factors such as volition and motivation for exploring the arena should also be considered.

Several flavonoids have been reported to exhibit anxiolytic action (Marder et al., 1995; Salgueiro et al., 1997). This activity is usually demonstrated using a popular test, the elevated plus-maze task (Pellow et al., 1985; Rodgers et al., 1997).

Our results are in agreement with these findings (Table 2), as group 2 showed an increase in time spent in the open arms, suggesting an anxiolytic effect of *V. ashei* extract.

Finally, the potential benefits of the *V. ashei* extract were also observed in the comet assay, a genotoxicity test which has been widely used in recent years to analyze protective effect on DNA damage. In our study, the higher (3.2 mg anthocyanins/kg) dose of the extract decreased DNA damage in both hippocampal and cortical tissues in basal conditions. This effect was not sufficient to significantly decrease DNA damage after H₂O₂ treatment, although it is possible that a protective effect could be observed after lower-intensity oxidative stress (such as lower concentrations of H₂O₂ or shorter treatment times). It is also possible that the antioxidant properties of compounds found in the extract are dependent on mechanisms which are functioning in vivo but are no longer working after tissue dissection and homogenizing. Results similar to ours have been reported for other phenolic compounds found in fruit, including berries containing quercetin, ellagic acid and some anthocyanins. Possible mechanisms for these genoprotective effects include protection of DNA from alkylation or formation of anthocyanin-DNA complexes, which

stabilize the molecule against oxidative attack (Ramirez-Tortosa et al., 2001; Beattie et al., 2005).

It is unclear, however, if the behavioral effects of *V. ashei* extract in our study can be explained by the same mechanisms. As the effect of the extract on memory was already seen 24 h after the beginning of treatment, it seems more likely that other mechanisms could account for the behavioral findings. Recent studies suggest that blueberry supplementation enhance several signaling pathways which have been widely shown to be important in memory formation, including hippocampal protein kinase C α (PKC α) and extracellular-regulated kinase (ERK) (Joseph et al., 2003; Youdim et al., 2004). Interestingly, Andrés-Lacueva et al. (2005) reported that blueberry supplementation and cognition are positively correlated with the total number of anthocyanin compounds found in the different brain regions. Alterations in these signaling pathways, therefore, as well as other factors such as regulation of neurotransmission, should be studied as possible mechanisms for the effects we have found. This does not exclude, however, that the long-term effects of supplementation could also be partly explained by neuronal preservation due to the extract's antioxidant activity (Joseph et al., 2005).

In conclusion, a lyophilized extract of *V. ashei* berries was shown to have memory-enhancing, anxiolytic and locomotion-increasing effects in mice, as well as protective effects against free radical-induced DNA damage in the brain. These results are consistent with the hypothesis that flavonoids (including anthocyanins) and other polyphenols can have effects in cell signaling and decrease oxidative damage, and also suggest that they might act directly on cognition. These effects may contribute to the prevention of age-related and pathological degenerative processes in the brain. The effects of these compounds in these pathological conditions remain to be tested.

Acknowledgements

Work supported by FAPERGS (Grants No. 04/0023.1 and No. 04/0498.9) and LAG is PD fellow of CNPq, Brazil. We are thankful to Dr. Paulo Abreu for the use of the epifluorescence microscope and Dr. José María Monserrat for the theoretical and practical help. This work is part of a cooperative program between the Fundação Universidade Federal do Rio Grande and Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

References

- Andrés-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr Neurosci* 2005;8:111–20.
- Aruoma OI, Bahorun T, Jen L. Neuroprotection by bioactive components in medicinal and food plant extracts. *Mutat Res* 2003;544:203–15.
- Barros DM, Izquierdo LA, Mello e Souza T, Ardenghi P, Pereira P, Medina JH, et al. Molecular signaling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial inhibitory avoidance learning in rats. *Behav Brain Res* 2000;114:183–92.
- Barros DM, Mello e Souza T, de David T, Choi H, Aguzzoli A, Madche C, et al. Simultaneous modulation of retrieval by dopaminergic D1-noradrenergic, serotonergic-1A and cholinergic muscarinic receptors in cortical structures of the rat. *Behav Brain Res* 2001;124:1–7.

- Barros DM, Pereira P, Medina JH, Izquierdo I. Modulation of working memory and of long-but not short-term memory by cholinergic mechanisms in the basolateral amygdala. *Behav Pharmacol* 2002;13:163–7.
- Beattie J, Crozier A, Duthie GG. Potential health benefits of berries. *Curr Nutr Food Sci* 2005;1:71–86.
- Cahill L, Brioni J, Izquierdo I. Retrograde memory enhancement by diazepam: its relation to anterograde amnesia and some clinical implications. *Psychopharmacology* 1986;90:454–6.
- Cantuti-Castelvetri I, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. *Int J Dev Neurosci* 2000;18:367–81.
- European Pharmacopeia Portuguesa 7 ed., Lisboa, 2002. CD-ROOM.
- Frank J, Kamal-Eldin A, Lundh T, Määttä K, Törrönen R, Vessby B. Effects of dietary anthocyanins on tocopherols and lipids in rats. *J Agric Food Chem* 2002;50:7226–30.
- Izquierdo LA, Barros DM, Vianna MRM, Coitinho AS, deDavid e Silva T, Choi H, et al. Molecular pharmacological dissection of short- and long-term memory. *Cell. Mol. Neurobiol.* 2002;22:269–88.
- Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Prior RL, Cao G, Martin A, et al. Long-term dietary strawberry, spinach, or vitamin e supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. *J Neurosci* 1998;18:8047–55.
- Joseph JA, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Bielinski D, Martin A, McEwen JJ, et al. Reversals of age-related declines in neuronal signal transduction, cognitive, and motor behavioral deficits with blueberry, spinach, or strawberry dietary supplementation. *J Neurosci* 1999;19:8114–21.
- Joseph JA, Arendash G, Gordon M, Diamond D, Shukitt-Hale B, Morgan D. Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer's disease model. *Nutr Neurosci* 2003;6:153–62.
- Joseph JA, Shukitt-Hale B, Casadesus G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am J Clin Nutr* 2005;81:313S–6S.
- Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry* 2003;64:923–33.
- Kuhnau J. The flavonoids. A class of semi-essential food components: their role in human nutrition. *World Rev Nutr Diet* 1976;24:117–91.
- Marder M, Viola H, Wasowski C, Wolfman C, Waterman PG, Medina JH, et al. C.: 6,3'-Dinitroflavone, a novel high affinity ligand for the benzodiazepine receptor with potent anxiolytic properties. *Bioorg Med Chem Lett* 1995;5:2717–20.
- Matsumoto H, Inaba H, Kishi M, Tominaga S, Hirayama M, Tsuda T. Orally administered delphinidin 3-rutinoside and cyanidin 3-rutinoside are directly absorbed in rats and humans and appear in the blood as the intact forms. *J Agric Food Chem* 2001;49:1546–51.
- McAnulty SR, McAnulty LS, Nieman DC, Dumke CL, Morrow JD, Utter AC, et al. Consumption of blueberry polyphenols reduces exercise induced oxidative stress compared to vitamin C. *Nutr Res* 2004;24:209–21.
- McGhie TK, Ainge GD, Barnett LE, Cooney JM, Jensen DJ. Anthocyanin glycosides from berry fruit are absorbed and excreted unmetabolized by both humans and rats. *J Agric Food Chem* 2003;51:4539–48.
- Miyazawa T, Nakagawa K, Kudo M, Muraishi K, Someya K. Direct intestinal absorption of red fruit anthocyanins, cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3,5-diglucoside, into rats and humans. *J Agric Food Chem* 1999;47:1083–91.
- Novas ML, Wolfman C, Medina JH, De Robertis E. Proconvulsant and anxiogenic effects of *n*-butyl-*b*-carboline-3-carboxylate, on endogenous benzodiazepine binding inhibitor from brain. *Pharmacol Biochem Behav* 1988;30:331–6.
- Ono M, Masuoka Ch, Koto M, Tateishi M, Komatsu H, Kobayashi H, et al. Antioxidant *ortho*-benzoyloxyphenyl acetic acid ester, vaccihin A, from the fruit of rabbiteye blueberry (*Vaccinium Ashei*). *Chem Pharmacol Bull* 2002;50(10):1416–7.
- Passamonti S, Vrhovsek U, Vanzo A, Mattivi F. Fast access of some grape pigments to the brain. *J Agric Food Chem* 2005;53:7029–34.
- Pellow S, Chopin P, File SE, Briley M. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. *J Neurosci Methods* 1985;14:149–76.
- Prior R, Cao L, Guohua AM, Sofic E, McEwen J, O'Brien C, et al. Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. *J Agric Food Chem* 1998;46:2686–93.
- Psimadas D, Messini-Nikolaki N, Zafitropoulou M, Fortos A, Tsilimigaki S, Piperakis SM. DNA damage and repair efficiency in lymphocytes from schizophrenic patients. *Cancer Lett.* 2004;204:33–40.
- Ramirez MR, Izquierdo IA, Bassols-Raseira MC, Zuanazzi JA, Barros D, Henriques AT. Effect of lyophilised *Vaccinium* berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats. *Pharmacol Res* 2005;52(6):457–62.
- Ramirez-Tortosa C, Andersen M, Gardner PT, Morrice PC, Wood SC, Duthie SJ, et al. Anthocyanin-rich extract decreases indices of lipid peroxidation and DNA damage in vitamin E-depleted rats. *Free Radic Biol Med* 2001;31(9):1033–7.
- Rimando AM, Kalt W, Magee JB, Dewey J, Ballington JR. Resveratrol, pterostilbene, and piceatannol in *Vaccinium* berries. *J Agric Food Chem* 2004;52:4713–9.
- Rodgers RJ, Cao BJ, Dalvi A, Holmes A. Animal models of anxiety on ethological perspective. *Braz J Med Biol Res* 1997;30:289–304.
- Salgueiro JB, Ardenghi P, Dias M, Ferreira MBC, Izquierdo I, Medina JH. Anxiolytic natural and synthetic flavonoid ligands of the central benzodiazepine receptor have no effect on memory tasks in rats. *Pharmacol Biochem Behav* 1997;58:887–91.
- Scalbert A, Williamson G. Dietary intake and bioavailability of polyphenols. *J Nutr* 2000;130:073S–208SS.
- Sellappan S, Akoh CC, Krewer G. Phenolic compounds and antioxidant capacity of Georgia-Grown blueberries and blackberries. *J Agric Food Chem* 2002;50:2432–8.
- Singh NP, McCoy M, Tice RR, Schneider E. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in single cells. *Exp Cell Res* 1988;175:184–191.
- Talavera S, Felgines C, Texier O, Besson C, Gil-Izquierdo A, Lamaison JL, et al. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *J Agric Food Chem* 2005;53:3902–8.
- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen* 2000;35:206–21.
- Tsuda T, Horio F, Osawa T. Absorption and metabolism of cyanidin 3-*O*-beta-D-glucoside in rats. *FEBS Lett* 1999;449:179–82.
- Youdim KA, Shukitt-Hale B, Martin A, Wang H, Denisova N, Bickford PC, et al. Short-term dietary supplementation of blueberry polyphenolics: beneficial effects on aging brain performance and peripheral tissue function. *Nutr Neurosci* 2000;3:383–97.
- Youdim KA, Michael S, Dobbie MS, Kuhnle G, Proteggente AR, Abbott NJ, et al. Interaction between flavonoids and the blood-brain barrier: in vitro studies. *J Neurochem* 2003;85:180–92.
- Youdim KA, Shukitt-Hale B, Joseph JA. Flavonoids and the brain: interactions at the blood-brain barrier and their physiological effects on the central nervous system. *Free Radic Biol Med* 2004;37:1683–93.

**Efeitos benéficos da suplementação com mirtilo no SNC: comparação entre
ratos adultos e ratos velhos**

Autores: Maria Rosana Ramirez, Maria do Carmo Bassols Raseira, Daniela Martí
Barros, Amélia T. Henriques.

Trabalho apresentado como conferencia no:

4º Simpósio Nacional do Morango

3º Encontro de Pequenas Frutas e Frutas Nativas do Mercosul

Publicado no: Livro de Memória do evento

EMBRAPA

Centro de Pesquisa agropecuária de Clima Temperado

A conscientização da manutenção da saúde seja por meio de uma alimentação balanceada ou por um estilo de vida saudável (exercícios físicos, ausência de fumo e moderação nas bebidas alcoólicas), está cada vez mais presente na sociedade. A população está preocupada em evitar o consumo de alimentos prejudiciais à saúde, e ao mesmo tempo aumenta o consumo de alimentos que podem contribuir para a melhoria da qualidade de vida.

Além dos consumidores, a indústria e a comunidade científica tem investido no setor dos alimentos, buscando maiores informações sobre substâncias e suplementos que contribuam para a melhoria da saúde. Neste contexto surgem os alimentos funcionais. Embora ainda não exista consenso mundial sobre os mesmos, de acordo com a ANVISA, o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais, além de atuar em funções nutricionais básicas, deverá desencadear efeitos benéficos à saúde e também ser seguro para o consumo sem supervisão médica. Os alimentos funcionais podem assumir várias formas: alguns podem ser alimentos tradicionais nos quais se reconheceu um determinado componente útil para a saúde (fibras, antioxidantes), buscando reduzir certas doenças em determinados grupos populacionais (leite fermentado, biscoitos vitaminados, cereais ricos em fibras, etc). Contudo, o produto contendo a substância funcional não substitui, por completo, o alimento de onde foi retirado tal composto, uma vez que apresenta apenas uma característica deste (TAIPINA *et al.*, 2002).

Com o aumento da longevidade de vida houve um crescimento da incidência de doenças crônicas como diabetes, enfermidades cardiovasculares, neurodegenerativas, câncer, obesidade etc., Embora os alimentos não promovam a cura destas doenças, muitos deles colaboram para uma melhor qualidade de vida (TAIPINA *et al.*, 2002).

Entretanto, a capacidade desses alimentos de influenciar a saúde humana depende também de vários fatores como interações com outros componentes da dieta, estado físico, fatores comportamentais e genética individual. Deve ficar bem claro que um alimento funcional não possui um papel terapêutico e não pode ser usado como substituição de qualquer medicamento, visto que as doenças crônicas

não-transmissíveis são multifatoriais e o controle de apenas um fator de risco, no caso a dieta, não é suficiente para o tratamento.

O declínio cognitivo e a demência são os problemas mais relatados em relação ao envelhecimento e alterações neurodegenerativas. As funções cognitivas, por sua vez, podem ser agrupadas de maneira geral em linguagem, compreensão, memória, motricidade e orientação. Essas funções nos permitem avaliar, perceber, armazenar, controlar e usar informações provenientes de fontes externas (meio ambiente) e internas (experiências vividas, memória) para reagir a determinados estímulos.

Para definirmos a memória de uma forma simples poderíamos dizer que esta é a aquisição, o armazenamento e a evocação de informações. Costuma-se classificar as memórias, em relação ao seu conteúdo, em dois grandes grupos: as memórias declarativas (aquelas para fatos ou eventos e qualquer informação que possa ser expressa conscientemente, por ex. guardar o nome e o telefone de alguém) e as memórias procedurais, as quais envolvem basicamente habilidades motoras e/ou sensoriais, também chamadas de hábitos (andar em bicicleta) (BARROS, 2004).

Do ponto de vista de duração, as memórias classificam-se em memória de curta duração, a qual dura de alguns minutos a poucas horas, e a memória de longa duração, que permanece dias, semanas e anos. Ambas possuem alterações (traços) bioquímicos. As memórias de curta e de longa duração são processos separados, mas interdependentes. Um teste utilizado para estudar a memória é a tarefa de esquiva inibitória, que se baseia no aprendizado associativo, onde um estímulo novo é pareado com outro "biologicamente significativo" (doloroso ou prazeroso) o qual produz uma resposta (fuga ou salivação, por exemplo); a resposta ao primeiro muda, condicionada ao pareamento.

Como sabemos, a memória explícita é a primeira a ser afetada com o envelhecimento, e esta alteração parece estar relacionada ao aumento de processos inflamatórios e o estresse oxidativo. Além disso, numerosos declínios cognitivos que ocorrem com a idade avançada podem ser manifestados por alteração no nível de neurotransmissores como, por exemplo: acetilcolina,

noradrenalina, serotonina, dopamina. Essas aminas biogênicas são importantes nos mecanismos subjacentes às disfunções mentais e neurológicas como a depressão, a dependência a drogas, a doença de Parkinson, a doença de Alzheimer, entre outras (JOSEPH *et al.*, 2005).

Entre os transtornos mais graves está a Doença de Alzheimer (DA), e uma das hipóteses possíveis é que a DA seja causada pela disfunção do sistema colinérgico central, o que justifica o emprego de drogas que inibem a degradação da acetilcolina. O efeito desses medicamentos é retardar o avanço da doença, e é com base nessa hipótese que se defende o emprego de alimentos funcionais e nutracêuticos.

Os alimentos funcionais podem ser de origem animal ou vegetal. A maior parte concentra-se nos alimentos de origem vegetal graças a seus fitoquímicos. Entre os primeiros alimentos considerados como funcionais se encontram as frutas do gênero *Vaccinium ashei*, os membros deste gênero são conhecidos por conter uma grande diversidade de compostos químicos, muitos dos quais exibem significativa atividade biológica (RIMANDO *et al.*, 2005).

Investigações fitoquímicas revelaram numerosos compostos fenólicos em *Vaccinium ashei*, os quais podem ser classificados em flavonóides e não-flavonóides. Do primeiro grupo fazem parte os flavanóis (catequina, epicatequina e epigallocatequina), flavonóis (caempferol, quercetina e miricetina) e antocianinas, e ao segundo grupo pertencem os ácidos fenólicos, hidroxibenzóicos e hidroxicinâmicos. Além destes compostos, pode-se encontrar também o resveratrol, polifenol pertencente à classe dos estilbenos (RIMANDO *et al.*, 2005).

Estudos epidemiológicos, *in vitro* e *in vivo* mostram vários efeitos benéficos à saúde relacionados aos compostos fenólicos citados, os quais são encontrados em alimentos de consumo cotidiano, tais como: atividades antiinflamatória, antimicrobiana, anticarcinogênica e antioxidante, bem como em diversos parâmetros neuronais vinculados ao envelhecimento (transdução de sinal alterações motoras, etc) (JOSEPH *et al.*, 2005).

Joseph e colaboradores (2005) demonstraram que a suplementação com mirtilo reverte os efeitos deletérios causados pelo envelhecimento e melhora a

atividade locomotora em ratos velhos. Em estudo complementar, dos mesmos autores, foi evidenciado que a suplementação com mirtilo melhora a função cognitiva em um modelo animal para doença de Alzheimer. Recentemente, o nosso grupo de pesquisa demonstrou que extrato total de *Vaccinium ashei* favorece diversos parâmetros comportamentais, e apresenta importante atividade antinociceptiva e neuroprotetora em roedores (RAMIREZ *et al.*, 2005; BARROS *et al.*, 2006).

Para dar continuidade a este trabalho, e na busca de alimentos mais saudáveis de maneira geral, o presente estudo objetivou comparar os efeitos da suplementação prolongada com *Vaccinium ashei* entre ratos velhos e ratos adultos, utilizando para isto a tarefa de reconhecimento de objetos, a qual está sendo largamente utilizada como um modelo para a investigação dos mecanismos neurobiológicos da aprendizagem e da memória.

Visto que a maioria dos estudos de aprendizagem e a memória utilizam tarefas espaciais e/ou aversivas, esta tarefa fornece uma ferramenta para avaliar a memória não-espacial, não-aversiva, e é sensível às manipulações genéticas e farmacológicas (DE LIMA *et al.*, 2005).

Os resultados deste estudo demonstram que o extrato total de *V. ashei* facilita a memória de curta duração nos ratos velhos, enquanto de maneira contrastante, facilita a memória de longa duração em animais adultos (figura 1 e 2). Após suplementação prolongada com o extrato de *Vaccinium ashei*, neste trabalho foi observado um efeito ansiolítico em animais adultos. Entretanto, não foram encontradas diferenças significativas entre ratos velhos tratados e controles (tabela 1).

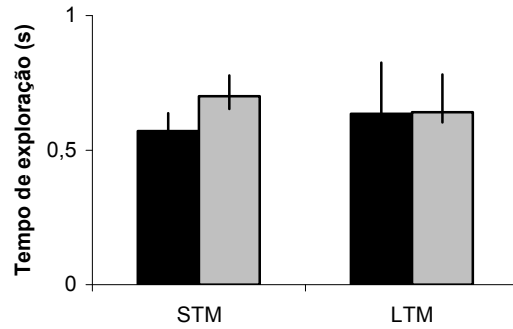


Figura 1. Efeito do tratamento prolongado (60 dias) de *Vaccinium* (2,6-3,2 mg/kg de antocianos) na tarefa de reconhecimento de objetos em ratos velhos. Latência medida 1:30 h (STM) e 24 h depois do treino (LTM). Valores expressos como mediana (rango interquartile), e as latências em segundos. n=15 por grupo. (*) indica diferença significativa com relação ao grupo controle (preto) $P < 0,05$.

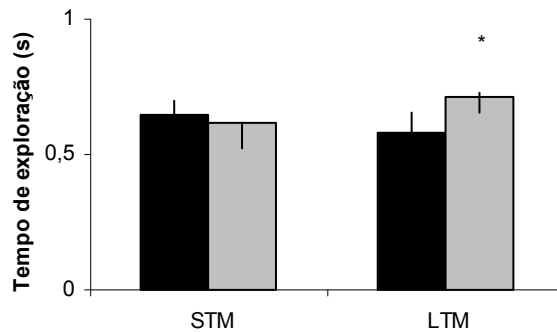


Figura 2. Efeito do tratamento prolongado (60 dias) de *Vaccinium* (2,6-3,2 mg/kg de antocianos) na tarefa de reconhecimento de objetos em ratos adultos. Latência medida 1:30 h (STM) e 24 h depois do treino (LTM). Valores expressos como mediana (rango interquartile), e as latências em segundos. n=15 por grupo(*) indica diferença significativa com relação ao grupo controle (preto) $P < 0,05$. (Mann–Whitney U-tests).

Tabela 1. Pluz maze

	Entradas totais	Entradas braços abertos	% de tempo braços abertos	bípede
Controle	10,40 ± 0,81	6,00 ± 0,74	22,12 ± 1,60	10,36 ± 1,77
Tratados	12,42 ± 1,31	6,58 ± 0,79	36,33 ± 4,27*	13,22 ± 1,74

Tabela 1. Efeito do tratamento prolongado (60 dias) de *Vaccinium* (2,6-3,2 mg/kg de antocianos) em ratos adultos. Os resultados são expressos em médias ± EPM (n= 15). (*) diferente do controle p<0,05.

Também foi possível demonstrar pela primeira vez, que o extrato de *V. ashei* administrado por via oral interagiu com o sistema serotoninérgico (via receptores 5-HT), no estriado e hipocampo de ratos adultos; porém, não foram observadas diferenças significativas em outras regiões corticais (figura 3 e 4).

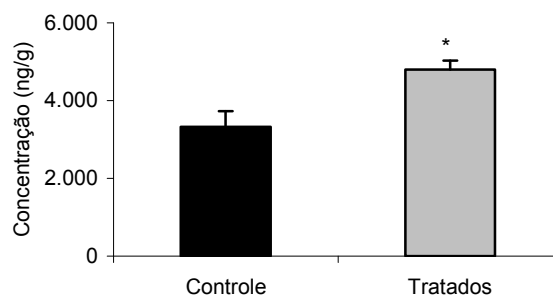


Figura 3. Efeito do tratamento prolongado (60 dias) de *Vaccinium* (2,6-3,2 mg/kg de antocianos) na concentração de 5-HT (serotonina) em hipocampo de ratos adultos. Os resultados são expressos em ng/g de tecido. As barras representam as médias ± EPM de 8 determinações. Controle (barra negra), tratados (barra cinza). (*) diferente do controle p< 0,05.

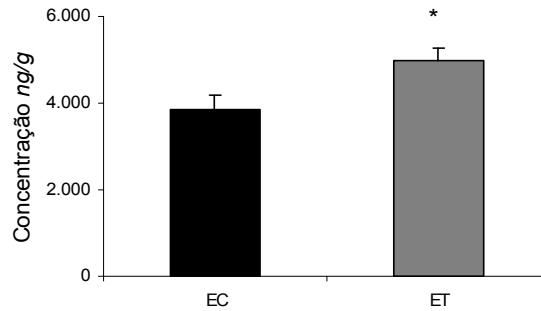


Figura 4. Efeito do tratamento prolongado (60 dias) do extrato de *Vaccinium* (2,6-3,2 mg/kg) na concentração de aminas (serotonina) em corpo estriado de ratos adultos. Os resultados são expressos em *ng/g* de tecido. As barras representam as médias \pm EPM de 8 determinações. Controle (barra negra), tratados (barra cinza). (*) diferente do controle $p < 0,05$.

Do mesmo modo foi possível observar que o pré-tratamento com o extrato produz neuroproteção basal no hipocampo e córtex cerebral nos animais adultos, porém não foram observadas diferenças significativas nos ratos velhos. Sugerimos que esses efeitos podem estar relacionados com a formação de um complexo entre os antocianos e o DNA, estabilizando, desta forma, a molécula frente ao ataque oxidativo. A atividade do extrato pode ainda ser atribuída à ação sinérgica e aditiva dos compostos presentes no extrato. Por outro lado, foi observado que antocianos isolados por cromatografia líquida de eficiência (CLAE), inibem a atividade da enzima acetilcolinesterase *in vitro*.

Em consonância com a literatura (JOSEPH *et al.*, 2005), os nossos resultados reforçam a hipótese de que este extrato é dotado de importante atividade sobre o SNC, e que este efeito poderia estar relacionado, pelo menos em parte, com uma modulação direta ou indireta das vias de sinalização neuronal. Tal inferência parte de evidências de que os sistemas colinérgico e serotoninérgico participam na modulação da resposta nociceptiva, bem como nos processos de memória e aprendizado (BARROS *et al.*, 2005).

Entretanto, os resultados observados nos ratos velhos podem ser decorrentes de alterações nas propriedades físicas da membrana plasmática

durante o processo de envelhecimento (incremento da rigidez), o qual provavelmente afeta a distribuição intracelular dos compostos bioativos. Porém, estes animais começaram o tratamento com 18 meses de idade, sendo assim parece razoável sugerir que quanto mais cedo se inicia a suplementação mais efetivo será o tratamento (JOSEPH *et al.*, 2005).

Neste sentido, foram obtidos avanços significativos acerca dos mecanismos de ação do *Vaccinium Ashei*, o que torna a fruta e seus princípios ativos interessantes para o aproveitamento como alimento com propriedades funcionais naturais, sendo desnecessária a aquisição de produtos funcionais industrializados, normalmente com custo mais elevado, para obter os nutrientes essenciais e os benefícios à saúde.

Considerações finais: Os estudos com animais são promissores, mas as evidências clínicas sobre a eficiência desse tipo de tratamento ainda são incipientes e necessitam de mais estudos. É fundamental para a saúde do cérebro, a longo prazo, o consumo dos diversos nutrientes em quantidades adequadas. Contudo restam ainda muitas perguntas a serem respondidas. Como o desempenho cognitivo pode ser melhorado pela alimentação em seres humanos jovens, adultos e crianças, e quais compostos bioativos poderiam efetivamente afetar o desempenho cognitivo?

Referências

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução n. 16*, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. Brasília, 1999.

RAMIREZ M.R., IZQUIERDO I.A., BASSOLS-RASEIRA M.C., ZUANAZZI J.A., BARROS D.M., HENRIQUES A.T. *Pharm. Res.*, 52, 457-462, 2005.

BARROS D.M., AMARAL O.B., IZQUIERDO I., GERACITANO L., BASSOLS RASEIRA M.C., HENRIQUES A.T., RAMIREZ M.R. *Pharm. Biochem. Behav.*, 84, 229-234, 2006.

BARROS D.M., RAMIREZ M.R., IZQUIERDO I. Modulation of working, short- and long-term memory by nicotinic receptors in the basolateral amygdala in rats. *Neurobiol. Learn. Mem.*, 83, 113-118, 2005.

JOSEPH J.A., SHUKITT-HALE B., CASADESUS G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal communication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. *Am. J. Clin. Nutr.*, 81, 313-316, 2005.

A memória. BARROS DM. *Texto publicado na revista eletrônica Comciência nº52 março 2004.* <http://www.comciencia.br>

DE LIMA M.N.M., LARANJA D.C., BROMBERG E., ROESLER R., SCHRODER, N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. *Behav. Brain Res.* 156, 139-143, 2005.

TAIPINA M.S., FONTS M.A.S., COHEN V.H. Alimentos funcionais – nutracêuticos. *Hig. Alimentar.* 16, 28-29, 2002.

9 CAPÍTULO V

INTRODUÇÃO

Uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao mesmo, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ATOUI *et al.*, 2005).

Espécies Reativas de Oxigênio (EROs), tais como o radical hidroxila ($\bullet\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e hidroperoxila ($\text{ROO}\bullet$), podem oxidar lipídios e proteínas ou causar danos ao DNA. Os EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poliinsaturados do colesterol e dos fosfolipídios, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno *bis*-alílico, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares (BARREIROS *et al.*, 2006).

Os radicais de carbono formados podem reagir com oxigênio originando radicais peroxila, que por sua vez podem atacar novas cadeias de ácidos graxos poliinsaturados, propagando a reação. Os hidroperóxidos formados na peroxidação lipídica têm vida curta e, quando reagem com metais, formam aldeídos (malonaldeído, acroleína, crotonaldeído) e epóxidos, os quais são reativos e causam novos danos ao DNA (VALKO *et al.*, 2004).

O processo de oxidação lipídica se instala no organismo quando ocorre deficiência no sistema natural de proteção do organismo ou quando há exposição a fatores que estimulam a produção de radicais livres, ou seja, quando fatores pró-oxidantes excedem a capacidade dos antioxidantes. Para manter o equilíbrio fisiológico do organismo, os sistemas de oxidação e proteção antioxidantes devem atuar de forma controlada sobre os substratos susceptíveis à oxidação (HALLIWELL, 1999).

A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena (superóxido dismutase, catalase), ou serem provenientes da dieta alimentar. Destas últimas, destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), carotenóides e polifenóis (SOARES, 2002; OMONI *et al.*, 2005).

Dentre as numerosas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a enzima lipoxigenase e cicloxigenase. Isto justifica estudos que avaliam o efeito inibitório de compostos fenólicos sobre enzimas de biossíntese dos eicosanóides, dada sua importância como antioxidante e devido à implicação destas substâncias na inibição de enzimas relacionadas à resposta inflamatória (HASLAM, 1996; SOARES, 2002).

A capacidade antioxidante destes compostos deve-se às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características desempenham um papel preponderante na neutralização ou seqüestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destes compostos (ZHENG e WANG, 2001; SOARES, 2002).

Embora as evidências sejam claras sobre a ação *in vitro* dos polifenóis com espécies reativas de oxigênio, eles podem, em determinadas circunstâncias, tal como os carotenóides, apresentar características pró-oxidantes (HASLAM, 1996). Este efeito está relacionado com o fenômeno de sinergismo entre antioxidantes, que se produz quando uma mistura de antioxidantes tem uma atividade mais acentuada do que a atividade dos antioxidantes individuais. São conhecidos dois tipos de sinergismo: um deles que implica na ação de aceptores de radicais livres misturados, e um outro que combina a ação de um acceptor de radical livre e um quelante de metais (NACZK *et al.*, 2002).

Na indústria alimentícia, a oxidação lipídica é inibida por seqüestradores de radicais livres. Os compostos mais utilizados com esta finalidade são o butil-hidroxi-anisol, butil-hidroxi-tolueno, *terc*-butil-hidroxi-quinona, tri-hidroxi-butil-fenona e galato de propila. Estudos têm demonstrado a possibilidade de estes antioxidantes apresentarem alguns efeitos tóxicos, e até mesmo ser potencialmente carcinógenos. O galato de propila, por exemplo, quando em presença de peróxido de hidrogênio reage com íons ferrosos formando espécies

reativas de oxigênio, as quais podem posteriormente atacar alvos biológicos (SOARES, 2002).

Em função dos possíveis problemas provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos. Paralelamente, objetiva-se a redução do consumo de alimentos processados de baixo potencial nutritivo bem como do emprego de produtos sintéticos em alimentos industrializados, fortalecendo o apelo de que o alimento deve desempenhar funções terapêuticas e não trazer riscos à saúde.

Na procura por alimentos mais saudáveis de uma maneira geral, o presente trabalho teve como objetivo trazer a sua contribuição ao conhecimento da funcionalidade das frutas de *Rubus* sp. como antioxidantes naturais e/ou como fornecedoras de fitoquímicos com potencial preventivo e terapêutico.

Diante disso, no primeiro estudo buscamos avaliar o potencial fitoquímico das amoras e resolvemos quantificar o teor de polifenóis: flavonóides e antocianos. A composição foi correlacionada com a bioatividade, utilizando o teste para detecção da atividade antioxidante frente à DPPH (BLOIS 1953) e o teste de inibição da motilidade leucocitária através do modelo de câmara de Boyden (Suyenaga, 2002).

Considerando que compostos fenólicos podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos, os resultados obtidos no trabalho prévio, estimularam a continuidade dos estudos para avaliar a ação antioxidante *in vivo* do extrato total e de substâncias isoladas das amoras. Para tanto, selecionamos como objeto de estudo o antociano majoritário (cianidina glicosilada) presente nessas frutas, onde o mesmo foi isolado e administrado de forma crônica nos animais.

O nosso objetivo foi avaliar os níveis de lipídios peroxidados pelo método de DRAPER e HADLEY (1990), em diferentes estruturas cerebrais de ratos adultos após suplementação prolongada com extrato de cianidina glicosídeo isolada de frutas de amora-preta.

9.1 Antioxidant and Chemotaxis Activities of Different Phenolic Fractions
Separated From Blackberry (*Rubus* sp.)

A ser submetido à revista *Química Nova* (em preparação)

9.2 Short communication: Effects of Cyanidin-3-Glucoside o Neuroprotection
in Rats

A ser submetido à revista *Brazilian Journal of Medical and Biological
Research* (em preparação)

Antioxidant and Chemotaxis activities of different phenolic fractions separated from Blackberry (*Rubus* sp.)

Maria Rosana Ramirez^a, Amélia Teresinha Henriques^{a*}, Miriam Apel

^a *Faculdade de Farmácia Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil.*

Abstract

Different cultivars of *Rubus sp* grown in Brazil were analyzed for antioxidant capacity (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl, DPPH) and the results related to the total phenol content. A high-performance liquid chromatographic (HPLC) method with photodiode array detection was used for profiles analysis. Main identified compounds were rutin, quercitrin, hyperoside and isoquercitrin; and cyanidin 3-glucoside was the major anthocyanin. The profile was correlated with the anti-inflammatory activity of the extracts, in the chemotaxis of polymorphonuclear leukocytes (PMN) model. We found that the flavonoid fractions significantly inhibited migration cellular and both total extract and fractions exhibited strong antioxidant activity *in vitro*. Therefore, these *in vitro* results provide the biochemical rationale for both diet design and *in vivo* animal and clinical studies.

Keywords: antioxidant properties; chemotaxis; *Rubus*.

e-mail: amelia@farmacia.ufrgs.br

Introduction

Polyphenolic compounds, characterized by an aromatic or phenolic ring structure, include flavonoids, phenolic acids, and lignans. These compounds are secondary plant metabolites and an integral part of human diets¹. While phenolics historically were considered in some instances to be antinutrients, interest in food phenolics has increased greatly because of their antioxidant capacity and possible beneficial effects in human health, such as cardiovascular disease, diabetes, high blood pressure, cataracts and degenerative diseases².

The interest in functional foods has guided plant breeders of crops such as blackberries to select genotypes with higher phenolic content and antioxidant activity. Blackberry (*Rubus* sp. Rosaceae) is a fruit, originating from North America and Europe. It is being cultivated in EMBRAPA/Clima Temperado, Pelotas (Southern Brazil), where it is popularly known as “amora preta”.

As with other fruits, blackberries contain large amounts of phytochemicals such as anthocyanins, flavonoids and phenolic acids that may act as natural antioxidants in human diet, which in turn may provide health-promoting effects to consumers³. It is well-known that levels of phenolics profile and the antioxidant capacity of *Rubus* species are influenced by maturity and that there is pronounced variation among cultivars within a species. Concentrations will be influenced by many factors including environmental such as degree of ripeness, cultivation site, climatic conditions, plant disease, processing and storage of the fruit⁴.

Recently, some studies have been published on the chemical properties of blackberry fruits and its products but the literature survey revealed that there are no scientific studies carried out regarding chemotaxis activity of the fruit of blackberry.

Because blackberry are grown in large scale in Pelotas (RS) and they are currently being promoted as a rich source of antioxidants, the present work focused on further characterization of berries grown in Pelotas city as possible sources of phenolics for functional foods application. For this reason, the objectives of this study were to investigate the variation in polyphenolic content, antioxidant

capacity and chemotaxis activity of different cultivars of blackberries extract, and to establish the relationship between the chemical composition and biological activity of both total extract and fractions.

Experimental

Chemicals and Reagents

Anthocyanidins standard were purchase from Sigma (St. Louis, USA); acetonitrile (HPLC grade) was obtained from Merck (Darmstadt, Germany) and trifluoroacetic acid (analytical grade) was obtained from Nuclear (Diadema, Brazil).

Preparation of lyophilized fruit extract and quantification

Representative samples of *Rubus* blackberries (Rosaceae) were collected at random from the cultivars: *Brazos*, *Cherokee*, *Comanche*, *Arapho*, *Xavante*, *Choctaw*, all originally American⁵. And three selections *Tupi*, *Guarani*, and *Caingangue* from these cultivars were also used in the mixture. Plants were produced by EMBRAPA DE CLIMA TEMPERADO, Pelotas, RS, Brazil, and kept at - 0.5 – 0 °C. Fresh berries from the cultivars described above were triturated mechanically and later lyophilized and kept sheltered from light and stored at -80 °C for further use.

Compositional analyses

Total Anthocyanins Assay: total anthocyanins were isolated following the procedure described in the European Pharmacopoeia⁶. Results were expressed as milligrams of cyanidin-3-glucoside equivalent per 100 g of fruit liophilized.

Total Phenolics Assay: Total polyphenols were estimated colorimetrically using the Folin-Ciocalteau reagent by the method of Brazilian Pharmacopoeia⁷ using gallic acid as a standard. The choice of Folin- Ciocalteau's reagent (which contains sodium molybdate and sodium tungstate solutions) for the quantification of phenolic compounds was based on the fact that it is more sensitive and more precise than other methods described especially. in view of the fact that, in plants,

these constituents are usually found as heteroside derivatives, soluble in water and other polar solvents. Thus, a wide range of phenolic compounds is quantified with basis on their ability to react with oxidizing agents to produce compounds that absorb at specific wavelength.

The total flavonoids: were estimated by the method of Brazilian Pharmacopoeia⁷. Quantification was based on the standard curve of quercetin.

Analytical Methods

Identification and quantification of each compound was based on retention time and UV/VIS spectra in HPLC-DAD (Waters 2695), by comparison with pure commercial standards of known concentrations, using a X Terra column. Gradient of mobile phase (A) water 0.1% TFA, (B) acetonitrile 0.1% TFA with a flow rate of 0.8 mL/min. Linear gradient, initial percentage of B (25%) to 15 minutes (100%); 10 μ L injection. Absorption of flavonoids was registred at 356 nm. The mobile phase was prepared daily, filtered through a 0.45 μ m membrane filter (Millipore) and sonicated before use. The standard was accurately weighted and diluted in methanol solution containing (1mg/mL). Standard solution (after dilution), was injected separately under directed HPLC conditions to generate curves for reference compound, and R^2 values exceeding $R^2 \geq 0.99$ (peak areas vs concentration).

Validation of the analytical method

The HPLC method was validated according to well established⁸ protocol, in agreement with International Conference on Harmonization guidelines. The method being examined for specificity, linearity, accuracy, precision, LOD and LOQ⁹⁻¹¹. For specificity validation, a volume of 10 μ l of standard, sample or blank solution was injected into the HPLC column and analyzed using an HPLC method as described above.

The linearity between peak area and concentration was analyzed using three calibration curves obtained in same day with standard solutions of rutin at 8 different concentrations each, ranging from 1.57 to 2.70 μ g mL⁻¹. The linearity was

evaluated by linear regression analysis, which was calculated by the least square regression method.

The accuracy of the method was accessed by analyzing samples of *Rubus* and that were spiked with known amounts of rutin standard solutions in triplicate. Sample recovery rate for the rutin from sample solutions were calculated as described by Cass e Degani¹².

The precision was carried out by repeatability (within-day) and intermediate precision (inter-day). The intra-day and inter-day precision values were obtained by triplicate analyses for each day and also per day over a 3-day period, respectively; and the repeatability of the assay method was evaluated by carrying out six independent assays of sample and calculated the % R.S.D.

Detection and quantification limits were estimated by the slope and mean standard deviation of standard rutin concentrations employed to construct the calibration curve, according to Eqs. (3) and (4).

$$\text{LOD} = \frac{3.3\sigma}{S}$$

where LOD is the estimated detection limit ($\mu\text{g ml}^{-1}$); σ , the standard deviation of y intercepts of regression lines; S is the slope of the calibration curve.

$$\text{LOQ} = \frac{10\sigma}{S}$$

where LOQ is the estimated quantification limit ($\mu\text{g ml}^{-1}$); σ , the standard deviation of y -intercepts of regression lines; S is the slope of the calibration curve. LOQ is defined as the lowest concentration of the analyte that can be determined with acceptable precision and accuracy under the stated experimental conditions.

Robustness is defined as the capability of an analytical procedure to remain unaffected by small but deliberate changes in the method parameters. Sample solutions were prepared and analyzed under the established conditions and by varying the flow rate.

Measurement of 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity.

In addition, the radical scavenging activity of the compounds was evaluated by using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical test. The method performed as described by Nakajima et al.¹³. Each berry extract was dissolved and diluted in ethanol at concentrations of 2.0, 1.5, 1.0, 0.5, and 0.25 mg/mL. The DPPH (100 μ M) radical scavenging activity obtained by each berry extract was compared with that of Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, 97 %, Aldrich Chem. Co), an analog of vitamin E and the result is expressed as the percentage of radicals scavenged after 30 min of reaction time.

Subjects

The subjects were adult male Wistar rats (aged 3 months), obtained from our own breeding colony. They were caged in groups of five with free access to food (standard certified rodent diet) and water, and were maintained on a 12-h light/dark cycle (lights on at 07:00 h), at a temperature of $23 \pm 1^\circ\text{C}$. Animals were randomly assigned to each treatment group.

The study was approved by the Animal Care and Use Committee of our center (Universidade Federal de Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, Brazil), and all efforts were made to reduce the number of animals used and their suffering.

Chemotaxis assay

Two representative cultivars samples of *Rubus* blackberries were selected at random for this assay (at dose 2 mg/ml and 1 mg/ml respectively). Chemotaxis assay *in vitro* was carried out by using two plates of multiwell-type Boyden chambers that were separated (from the chemotactic stimulant, LPS) by a filter (Millipore Corp. Bedford, Mass.), according to minor modification of the Zigmond methods¹⁴. After the incubation 37°C , the chambers were emptied and the filters were removed fixed and stained with hematoxylin. Chemotaxis (migration) was measured by using the micrometer on the fine focus knob of the microscope, in triplicate samples. Boyden technique for chemotaxis assay is recommended for clinical investigation due to its high level standardization. The inhibition of *in vitro*

migration makes it possible to predict some complications that might be avoided during an *in vivo* assay.

Statistical analysis

Data are expressed as mean and standard errors and analyzed with one-way ANOVA TUKEY. In all comparisons, $p < 0.05$ was considered to indicate statistical significance.

Results

The results of previously described analysis are represented in Table 1. As shown in the table, the contents of polyphenolic compounds subgroups (anthocyanins, and flavonoids) were variable. Average values for the natural antioxidants were found as 843 to 500 mg/100 g dry weight (DW), total anthocyanins, 113 to 40, mg/100 g DW total flavonoids, and 2188 to 1206 mg/100 g DW total phenolics.

The DPPH assay was used to measure the total antioxidant activity of blackberry. Various phytochemical components, including the flavonoids, anthocyanins, and phenolic acids are known to be responsible for antioxidant capacity in fruits. Among the cultivars assayed, the values were found to be in the range of 48 to 83 % (figure 1). The antioxidant capacity may be related to the content of phenolic compounds in these blackberry samples.

Total extracts and flavonoids fraction also (table 2), inhibited chemotaxis of leukocytes in rats (*in vitro*) when compared to control group. Results similar to ours have been reported for purified flavonoid¹⁵ for example, quercetin, isoquercitrin, rutin, and quercitrin, hence the inhibitory activity can be attributed to these compounds. The mechanisms through which extract exerts its actions still remain incompletely understood, and require further studies.

HPLC chromatographic profiles of lyophilized blackberry flavonoids were qualitatively similar yet quantitatively very different. This HPLC method has been validated revealing good specificity for the analysis of the flavonoids contained in

berries. The separation process was performed within 15 min. A good separation effect for these compounds was obtained with our methodology.

Simultaneous quantification of all these compounds in a single operation is much more convenient than using several separate procedures, especially for routine analysis or for a large number of samples. One of the greatest advantages is the simplification of the overall analytical process, for example, by reducing the frequency of changing the separation system, reducing the number of mobile phase preparations, and reducing the number of times the calibration curves have to be made, as well as the number of sample injections.

Quantification parameters for *Rubus* using the above-described analytical HPLC method were examined. The results are presented in chapter 1. We further identified the main active components of *Rubus* as rutin, quercetrin hyperoside, isoquercetrin, an ordinary flavonoid that is ubiquitous in nature, as well as the most commonly encountered flavonoids in vegetable foodstuffs.

Discussion

The amounts of flavonoids, anthocyanins, and poliphenols total found in extracts of whole berries of *Rubus* sp. cultivars randomly collected from the states of Rio Grande do Sul, Pelotas were variable (Table 1). These variations may be due to the type of the cultivars, annual factors, postharvest storage conditions and processing. The average total anthocyanin contents among blackberries cultivars are 113.55, 84.12, and 116.59 mg/ 100 g dry weights (DW). Wang et al. 36 reported the total anthocyanin contents of some fruits, including blackberry, as 7-495 mg 100 g⁻¹. Recently, anthocyanins was reported in *Rubus L* from Georgia, at levels of approximately 116 to 256 mg/g fresh weights (FW). These levels, however, were reported in grams of fresh berries and could not be compared with data in this study, which were analyzed in lyophilized berries.

Low levels of poliphenols (including flavonoids) were found in this study as compared with those from North Carolina, Mississippi, Georgia and Oregon^{1,4}. It was not possible to compare the *Rubus* poliphenols levels obtained in this study

with those reported in the literature because the literature values were based on fresh weights and not the whole fruit as presented here. Data on the Canadian and Georgia samples are included for information purposes.

Phenolic matters also have a high antioxidant activity and they give a strong contribution to the antioxidant power, so there is a linear correlation between total phenolic content and antioxidant activity of small fruits. Data presented here indicate that, blackberries extract have the highest antioxidant capacity, as estimated using DPPH test (figure 1). The most consistent and highest correlations were those between total polyphenols and antioxidant capacity (Table 1).

However, scarce information is available on the contribution of different phenolic subgroups in this observed activity. In a separate analysis in each of the 2 fraction collected there was found a positive relationship between DPPH and fraction (data not shown). Notably, both fractions showed strong levels of radical scavenging activity (36% and 28% respectively) to total berry extract (71.23%). These results confirm previous reports that polyphenols were better correlated with antioxidant capacity than were anthocyanins. Polyphenols encompass a wide range of compounds with distinct structural and functional properties, such as antioxidant activity that depend on structural features like the number of available hydroxyl groups, therefore, the antioxidant capacity of a *Rubus* containing a mixture of polyphenolic will depend on the specific phenolic profile which can be qualitative (type of phenolics present) or quantitative (the relative amounts or proportions of phenolics present)¹⁵.

HPLC chromatographic profiles of lyophilized blackberry were qualitatively similar yet quantitatively very different. Nonetheless, one anthocyanin patterns were observed, it consisted of cyanidin 3-glucoside as the major pigment. These patterns are consistent with previous investigations from other laboratories^{1,4}. This HPLC method has been validated revealing good specificity for the analysis of the flavonoids contained in berries.

Quantification of the major flavonoids from 9 *Rubus* samples was undertaken using the above-mentioned analytical method. The qualitative

composition of blackberry flavonoids was similar for all cultivars yet quantitatively very different the results are as indicated (previously shown in capitulo 1).

We further identified the main active components of *Rubus* as rutin, quercetrin (heterosides of quercetin) hyperoside, isoquercetrin, an ordinary flavonoid that is ubiquitous in nature, as well as the most commonly encountered flavonoids in vegetable foodstuffs. Additionally, numerous studies describe the different biological effects that are attributed to flavonoids. These include antioxidation, antiinflammation effects, and antiplatelet action and they inhibit enzymes whose expression and/or activity increase in inflammatory processes among others ^{16,17}.

Some flavonoids, especially quercetin, are reported to protect low-density lipoprotein from oxidative damage *in vitro* and are thought to reduce the risk of cancer. Hyperoside has anti-inflammatory and enhances the antioxidative capacity ¹⁸. Rutin was reported to act as an efficient radical inhibitor and have a neuroprotective effect against ischemia and reperfusion induced cerebral injury. Quercitrin shown anti-inflammatory activity in intestinal inflammation rat model ^{19,20}.

At the both dose used in the experiments (1 and 2 μ g), the total extract and the flavonoids fraction exhibited the similar pattern of chemotaxis inhibition. The anti-inflammatory activity has been correlated with the presence of similar flavonoids in the extract. This property was not observed with the anthocyanins fractions. Besides confirming the direct correlation between the total flavonoid compounds in the fruit extract of *Rubus* and the anti-inflammatory activity. Although it remains unclear which flavonoids component of *Rubus* shows effects on chemotaxis *in vitro*, the abilities of *Rubus* may be a collaboration of multicomponents in the flavonoids fraction.

Conclusion, the anti-nociceptive activity of *Vaccinium ashei* were evaluated using both chemical and thermal methods of nociception in mice. These methods are used to detect central and peripheral analgesics. From the results it could be concluded that the extracts exhibit anti-nociceptive activity by central as well as peripheral mechanism(s). Therefore, these *in vitro* studies provide the biochemical rationale for both diet design and *in vivo* animal and clinical studies.

References

1. Sellappan, S.; Akoh, C. C.; Krewer, G. J. *Agric. Food Chem.* **2002**, 50,2432.
Alonso, R.; Cadavid, I.; Calleja, J. M. *Planta Med.* **1980**, 46 (Suppl.), 102.
2. Wang, H.; Nair, M. G.; Strasburg, G. M.; Chang, Y. C.; Booren, A. M.; Gray, J. I.; J. Nat. Prod. **1999**, 62,802. Swanston-Flatt, S. K.; Day, C.; Bailey, C. J.; Flatt, P. R. *Diabetologia* **1990**, 33 462.
3. Wang, S. Y.; Lin, H. S. J.; *Agric. Food Chem.* **2000**, 48,140. Hamel, P. B.; Chiltoskey, M. U. *Cherokee plants.* (1975) Raleigh, NC: Herald. 7.
4. Siriwoharn, T.; Wrolstad, R. E.; Finn, C. E.; Pereira, C. B.; *J. Agric. Food Chem* **2004**, 52,8021.
5. Clark, J.R. *Acta Hort.* **1999**, 505,73.
6. *European Pharmacopeia Portuguesa* 7 ed., Lisboa, (2002). CD-ROOM.
7. *Brazilian Pharmacopoeia.* 5 fasciculo (2003).
8. International Conference on Harmonization (ICH); *Guidance for industry Q2B: Text on Validation of Analytical Procedures*, November **1996**.
9. *Guide for Validation of Analytical and Bioanalytical Methods.* Resolution RE n°. 899, *Brazilian Sanitary Surveillance Agency*, Brasilia, Brazil, **2003**.
10. Shabir, G. A.; *J. Chromatogr. A* **2003**, 987, 57.
11. Jenke, D. R. J.; *Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **1996**, 19, 737.

12. Cass, Q. B.; Degani, A. L. G.; São Paulo: *Universidade Federal de São Carlos*, **2001**.
13. Nakajima, J.; Tanaka, I.; Seo, S.; Yamazaki, M.; Saito, K. J. *Biomed Biotechnol* **2004**, 5:241.
14. Zigmond, S. H.; Hirsch, J.G.; *J. Exp. Med.* **1973**, 137,387.
15. Moyer, R. A.; Hummer, K. E.; Finn, C. E.; Frei, B.; Wrolstad, R. E.; *J. Agric. Food Chem.* **2002**, 50,519.
16. Akbay, P.; Basaran, A. A.; Undeger, U.; Basaran, N.; *Phytoter. Res.* **2003**, 17,34.
17. Nijveldt, R. J.; van Nood, E.; van Hoorn, D. E. C.; Boelens, P. G.; van Norren, K.; van Leeuwen, P. A. M.; *Am. J. Clin. Nutr.* **2001**, 74,418.
18. Melzig, M. F.; Pertz, H. H.; Krenn, L.; *Phytomedicine.* **2001**,8,225.
19. Gupta, R.; Singh, M.; Sharma, A.; *Pharmacol Res.* **2003**,48,209.
20. Palmer, H.; Ohta, M.; Watanabe, M.; Suzuki, T.; *J Photochem Photobiol B.* **2002**,67,116.

Acknowledgements: Work supported by, FAPERGS and CNPq, Brazil.

Table 1. Individual Anthocyanins, flavonoids and poliphenols in blackberries (values are averages of triplicate analyses).

Cultivars	<i>Blackberries (Rubus sp.)</i>		
	anthocyanins	flavonoids	polyphenols
	(mg/100g fruit liophilized)		
<i>Comanche</i>	681 ± 5.50	102 ± 0.90	2188 ± 0.06
<i>Xavante</i>	583 ± 4.93	94 ± 0.66	1799 ± 0.02
<i>Choctaw</i>	785 ± 5.20	78 ± 0.57	1706 ± 0.05
<i>Brazos</i>	843 ± 2.00	55 ± 0.88	1605 ± 0.02
<i>Arapho</i>	860 ± 0.88	113 ± 0.33	1513 ± 0.03
<i>Caingangue</i>	500 ± 1.86	67 ± 0.66	1399 ± 0.02
<i>Guarani</i>	627 ± 4.93	96 ± 0.57	1310 ± 0.10
<i>Tupy</i>	650 ± 3.51	40 ± 0.88	1301 ± 0.02
<i>Cherokee</i>	524 ± 2.90	75 ± 0.58	1206 ± 0.02

Table 1. Total anthocyanins were expressed as cyanidin-3-glucoside equivalents expressed per 100 g of fruit liophilized. Poliphenols and Flavonoid concentration based upon gallic acid or quercetin respectively as standard expressed per 100 gram of liophilized fruit.

Table 2. Chemotaxis inhibition of flavonoids fraction.

Groups	Migrated Distance (μm)
Control	120 \pm 3.0
Extrato total from <i>Rubus</i>	80 \pm 2.0*
Flavonoids fraction from <i>Rubus</i>	12 \pm 0.5*

Table 2. Effect of *Rubus* flavonoids fraction on chemotaxis assay *in vitro*. Data are expressed as means \pm SEM. (*) significant difference from the control, $p < 0.05$.

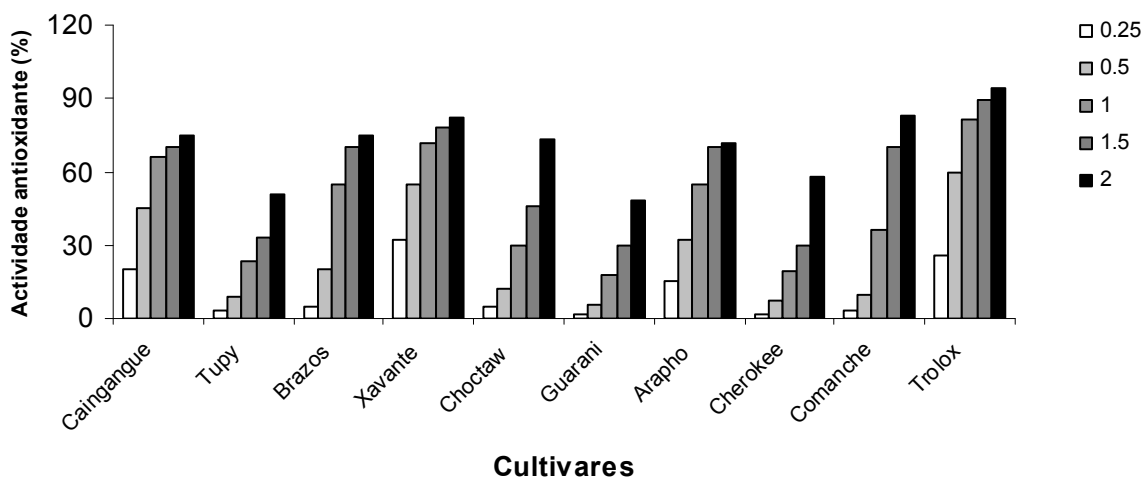


Figure 1. Radical scavenging activities of *Rubus* sp. extracts. Extract was dissolved in ethanol at concentrations of 2.0, 1.5, 1.0, 0.5, and 0.25 mg/mL of anthocyanins. The *Rubus* extracts were incubated with DPPH for 30 minutes, and the absorbance at 517nm due to DPPH radical was determined. Trolox was used as a control.

Effects of Cyanidin -3-Glucoside on Neuroprotection in Rats

M R Ramirez^a, Mariana Leivas Muller Hoff^b, MC B Raseira^b, J C F Moreira^b, A T Henriques^{a*}.

^a Faculdade de Farmácia

^b Centro de Estudos em Estresse Oxidativo, Departamento de Bioquímica, ICBS, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

^c Embrapa Clima Temperado, Pelotas ,RS, Brazil.

Abstract

Blackberries growing in Brazil were analyzed for total anthocyanins, by high-performance liquid chromatographic method with photodiode array detection and showed cyanidin 3-glucoside as the major anthocyanins. In addition it was tested the efficacy of oral (3.6 mg/kg day) administration of cyanidin 3-glucoside isolated from *Rubus* sp. on lipid peroxidation in brain rats. It was found that the cyanidin extract significantly reduced lipid peroxidation in hippocampal tissue. This result suggests that the purified cyanidin 3-glucoside is bioavailable and also of high physiological relevance. To the author's knowledge, this is the first study of efficacy of cyanidin-3-glucoside on neuroprotection.

Key words: cyanidin 3-glucoside, lipid peroxidation, hippocampus

* e-mail: amelia@farmacia.ufrgs.br

Blackberries (*Rubus* sp.) are a rich source of dietary phenolic compounds such as anthocyanins, flavonoids as well as proanthocyanidins that may act as normal antioxidants in our diet. Previous reports have been done on blackberry anthocyanins, and their identities have been well-characterized as being solely cyanidin-based compounds. In particular, five anthocyanins are detected and cyanidin 3-glucoside was the major anthocyanin (1, 2).

It is of great relevance to study thoroughly the actions of the glycosylated compounds since they are the native forms occurring in plant as well as in fruit extracts. The role of glucosides in diets has become even more significant as it was suggested that in the human and rodents gastrointestinal tract flavonoids, including some anthocyanins may be absorbed as intact glucosides into the circulation, and that they are able to cross the rat blood-brain barrier after (blueberry, blackberry) supplementation, suggesting that these compounds can feasibly have a direct effect on brain processes (3,4).

Otherwise, results from experimental studies have reported a protective role in cognitive function (5), and different pathologies (6). Thus, it is important to identify and quantify these important compounds, and the mechanisms responsible for those effects.

The objective of this research, was to investigate the anthocyanins of *Rubus* cultivars. For the evaluation we tested the efficacy of cyanidin-3-glucoside extracted from blackberries on lipid damage in brain rats. Plants were produced by Embrapa De Clima Temperado, Pelotas, RS, Brazil, and kept at - 0.5 - 0°C (7). Fresh berries were triturated mechanically and later lyophilized and kept sheltered from light. Identification of each compound was based on retention time and UV spectra in HPLC-DAD (Waters 2690), by comparison with pure commercial standards of known concentrations, using a C18 reverse-phase column. Gradient of mobile phase (A) water with 0.8% TFA, (B) acetonitrile 0.8% TFA with a flow rate of 0.7 mL/min, absorption of anthocyanins were detected at 520 nm. We have used cyanidin chloride the standar was diluted in methanol solution containing 2 N HCl (1mg/mL). Total Anthocyanins, was determined according to the procedure described in the European Pharmacopoeia (2002)

For cyanidin-3-glucoside extraction, the *Rubus* extract was dissolved in methanol and separated on an preparative on a MPLC apparatus (BUCHI), aliquots of extract were repeatedly fractionated. The solvent was removed in a rotatory evaporator and were

redissolved in water and immediately administered in the animals. During this experiment the adult Wistar rats consumed 3.2 - 3.6 mg/kg/day (oral), of anthocyanins for 30 days. The experiments were performed according to the “Principles of Laboratory Animal Care and Use in Research” (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA/UFRGS, RS-Brazil). The animals were sacrificed by decapitation at 24 h after the last extract administration. Hippocampi, striatum and cerebral cortices were dissected out immediately after the rat was sacrificed. As an index of lipid peroxidation, we used the formation of TBARS during an acid-heating reaction, which is widely adopted as a method for measurement of lipid redox state, as previously described (8). Results are expressed as nmol TBARS/mg protein (9).

Experiments from our and other laboratories have shown that supplementation with berries rich in anthocyanins are effective in reducing oxidative DNA damage in brain tissue *in vitro*, and are beneficial in reversing age-related neuronal and behavioral changes (5,6,10). However, there are few reports on biological activities of these purified compounds, related with neuroprotective effects, probably due to the poor availability and high price of the commercial anthocyanin standards.

It has been proposed that cyanidin (aglycone) inhibited H₂O₂-induced lipid peroxidation in the cortical tissues, by acting as O₂⁻ scavengers and O₂ quenchers and also reacts with peroxy radicals which are responsible for radical chain reactions during lipid peroxidation (11). The present study found that the cyanidin-3-glucoside, extracted from *Rubus* fruit significantly decreased lipid peroxidation processes in hippocampal tissues in basal conditions (Fig. 1). This effect was not sufficient to significantly decrease lipid damage in striatum and cerebral cortices after treatment, although it is possible that a protective effect could be observed after long treatment times period. It is also possible that an anthocyanin compound exerts a site specific action, which is related to the cell origin and distribution of anthocyanins. Likewise, it has been recently shown that blueberry supplementation and cognition are positively correlated with the number of different anthocyanin compounds (not their total amounts) found in the distinct brain regions (3).

In conclusion, cyanidin-3-glucoside may be a significant factor in maintaining neuronal integrity and preventing lipid peroxidation. Given these results, it is important to determine if the neuronal protection provided by cyanidin-3-glucoside administration

translates into improvements in behavioral function such as age-related deficits in cognitive performance. Further studies are in progress to assess the in vivo antioxidant potential of cyanidin-3-glucoside in behavioral performance.

References

1. Siriwoharn T, Wrolstad RE, Finn CE, Pereira CB. Influence of Cultivar, Maturity, and Sampling on Blackberry (*Rubus* L. Hybrids) Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Properties. *J Agric Food Chem* 2004; 52:8021-8030.
2. Moyer RA, Hummer KE, Finn CE, Frei B, Wrolstad RE. Anthocyanins, phenolics, and antioxidant capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. *J Agric Food Chem* 2002; 50:519-525.
3. Andrés-Lacueva C, Shukitt-Hale B, Galli RL, Jauregui O, Lamuela-Raventos RM, Joseph JA. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. *Nutr Neurosci* 2005; 8:111-120.
4. Talavera S, Felgines C, Texier O, Besson C, Gil-Izquierdo A, Lamaison JL, et al. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. *J Agric Food Chem* 2005; 53:3902-3908.
5. Ramirez MR, Izquierdo IA, Bassols-Raseira MC, Zuanazzi JA, Barros D, et al. Effect of lyophilised *Vaccinium* berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats. *Pharmacol Res* 2005; 52:457–462.
6. Joseph JA, Arendash G, Gordon M, Diamond D, Shukitt-Hale B, Morgan D. Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer's disease model. *Nutr Neurosci* 2003; 6:153–162.

7. Clark JR. The blackberry breeding program at the University of Arkansas: thirty-plus years of progress and developments for the future. *Acta Hort* 1999; 505:73-77.
8. Draper HH, Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol* 1990; 186:421–431.
9. Lowry OH, Rosebrough AL, Randal RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193:265–275.
10. Barros DM, Amaral, OB, Izquierdo I, Geracitano L, Bassols Raseira MC, Henriques AT, et al. Behavioral and Genoprotective Effects of *Vaccinium* Berries Intake in Mice. *Behav Brain Res* 2006; 84:229.
11. Noda Y, Kaneyuki T, Mori A, Packer L. Antioxidant of Pomegranate Fruit Extract and Its Anthocyanidins: Delphinidin, Cyanidin, and Pelargonidin. *J Agric Food Chem* 2002; 50:166-171.

Acknowledgements: This work was supported by grants from CNPq, PROPESQ-UFRGS and FAPERGS.

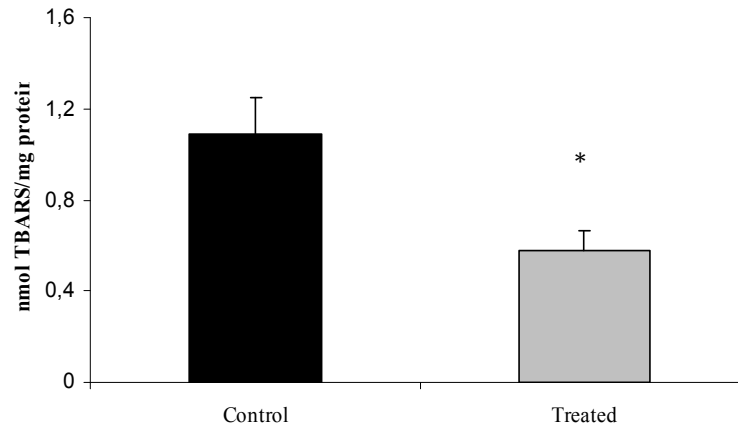


Figure 1. Effects of chronic supplementation of cyanidin-3-glucoside on lipid peroxidation in adult rat hippocampus. Data are mean \pm SD of 10 animals per group performed in triplicate. Results are expressed as nmol TBARS/mg protein. * Different from the respective control group $p < 0.05$ as determined by one-way ANOVA followed by Tukey's test.

10 DISCUSSÃO

No passado os alimentos eram tidos principalmente como fontes de substâncias essenciais para o preenchimento dos requisitos nutricionais básicos. A partir dos anos 80 o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico tem aumentado significativamente, com o intuito de substituir os antioxidantes sintéticos, os quais têm demonstrado potencial cancerígeno e outros efeitos indesejáveis a saúde humana (ZHENG e WANG, 2001).

Alimentos funcionais ou nutracêuticos, termos que se referem aos alimentos ou aos ingredientes isolados a partir de alimentos que trazem benefícios fisiológicos à saúde, constituíram um dos principais focos da indústria de alimentos nos anos 90. O crescimento mais acentuado ocorreu os últimos 5 anos e esta tendência deve continuar ascendente na medida em que se intensificam as pesquisas científicas a respeito dos componentes bioativos presentes nos alimentos e seu papel para a manutenção da saúde. Os estudos estão centralizados nos compostos fenólicos, pois eles agem como receptores de radicais livres interrompendo a reação em cadeia provocada por estes radicais (BARREIROS *et al.*, 2006).

Um dos pontos cruciais nesse sentido é determinar quais são os níveis ótimos dos compostos bioativos que estão em estudo. Esta é uma questão central no marco da segurança alimentar e nutricional, uma vez que pode trazer problemas para a saúde se a dosagem não for adequada. Existe, portanto, a necessidade de se realizar maior número de pesquisas sobre as substâncias biologicamente ativas para determinar os efeitos benéficos específicos, níveis máximos e mínimos de ingestão, com garantia de eficácia e ausência de riscos de toxicidade e para avaliação de ocorrência de efeitos colaterais de longo prazo. Diante do exposto, selecionamos o mirtilo e a amora-preta como objeto de nosso estudo visando incluí-los no rol dos alimentos funcionais.

A identificação dos constituintes foi realizada por CLAE acoplado a detector de arranjo de fotodiodos e comparação do tempo de retenção de amostra. Avaliando-se o pico referente ao marcador encontrado no cromatograma da especificidade, pode-se considerar o método proposto específico, pois em todas

faixas analisadas o pico não apresentou variação nos seu máximo de absorvância indicada no CLAE/PDA.

A precisão dos métodos foi avaliada mediante a determinação dos parâmetros repetibilidade e precisão intermediária da solução extrativa. O desvio padrão foi determinado e analisado através da medida das áreas do pico de interesse presente na amostra. Analisando-se os resultados pode-se dizer que os métodos desenvolvidos para caracterizar as amostras de *Vaccinium ashei* e *Rubus* sp. demonstram repetibilidade e precisão em suas análises.

Os métodos mostraram ser exatos quanto ao valor da substancia química de interesse recuperada para as análises realizadas com *Vaccinium ashei* e *Rubus* sp. Observou-se que tanto LD quanto LQ estão inseridos nos valores utilizados para a construção da curva do marcador, tal fato não comprometeu os valores de DPR% obtidos indicando que o método cromatográfico utilizado apresenta boa sensibilidade.

Em relação ao teste de robustez, as mudanças estabelecidas não alteraram significativamente o cromatograma, assim é possível afirmar que o método desenvolvido é capaz de suportar mudanças na coluna, no gradiente, e no fluxo da fase móvel. De uma maneira geral, os dois métodos analíticos propostos neste estudo poderiam ser adotados para a avaliação das amostras de *Rubus* sp. e *Vaccinium ashei*, e pode-se inferir que os métodos em questão estão validados, garantindo confiabilidade aos resultados obtidos.

Sellappan e colaboradores (2002) estudando a composição química de vários cultivares de *Vaccinium* e *Rubus*, destacaram a grande riqueza de flavonóides presentes nestes gêneros estudados. No presente estudo, foram identificados os flavonóides: quercitrina, isoquercitrina, e hiperosídeo em ambos gêneros; sendo que a rutina foi detectada apenas em cultivares do gênero *Rubus* sp. A partir da análise cromatográfica, também foram caracterizadas cinco antocianidinas, já conhecidas, no gênero *Vaccinium ashei*: delphinidina, cianidina, petunidina, peonidina e malvidina. A comparação dos perfis cromatográficos e a caracterização dos compostos presentes nas cultivares mostraram que o perfil químico é muito semelhante, porém quantitativamente diferente. Com relação ao

gênero *Rubus* sp. foi observado que cianidina é a principal antocianidina presente nestas frutas. Essa diversidade de resultados obtidos para as diferentes amostras está de acordo com vários autores, que sugerem que a composição química dos compostos principais encontrados nestas frutas é quantitativamente distinta, dependendo das diferenças regionais, de fatores genéticos e ambientais, mesmo quando originários da mesma região (PRIOR *et al.*, 1998; SIRIWOHARN *et al.*, 2004).

O isolamento seguido de identificação dos constituintes mais importantes de um vegetal, responsáveis ou não pela ação biológica do mesmo, permitem identificar a espécie vegetal e conjuntamente com ensaios de atividade biológica, analisar e caracterizar frações ou substâncias bioativas. A atividade antioxidante é um parâmetro vastamente utilizado (em conjunto com outros) para caracterizar diversos materiais biológicos. Esta atividade está relacionada com compostos capazes de proteger um sistema biológico contra os efeitos danosos de reações que causam oxidação excessiva, envolvendo espécies reativas de oxigênio (nitrogênio) (ARNAO, 2000).

O progresso de diferentes reações cinéticas depende da natureza do antioxidante avaliado. Podem ocorrer três tipos de comportamentos cinéticos entre as amostras: cinética rápida, atingindo o final da reação em menos de 1 minuto; cinética intermediária quando o final da reação é atingido em até 30 minutos e cinética lenta quando a reação demora mais de uma hora para finalizar (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; NIKI, 2002). Neste estudo, não foram observadas variações no perfil cinético das reações de consumo do DPPH• entre os extratos etanólicos de cada amostra independentemente da cultivar utilizada.

Outro modo para analisar a capacidade antioxidante das amostras frente ao radical livre DPPH• é avaliar a porcentagem de degradação deste radical livre, fixando a concentração de extrato e avaliando a cinética de tempo reacional. Os dados de atividade antioxidante para os extratos analisados, estão de acordo com outros autores que afirmam que a atividade antioxidante é determinada não apenas pela reatividade do antioxidante contra o radical livre, mas também pela concentração do antioxidante utilizado (NIKI, 2002). Entre as amostras coletadas

tanto de *Rubus* sp. quanto de *Vaccinium ashei*, as que apresentaram maior atividade foram aquelas com maiores teores de polifenóis totais, sugerindo uma grande influência destes compostos na atividade anti-radical livre das amostras.

Evidências descrevem a atividade destes princípios ativos sobre os efeitos de alguns mediadores químicos da inflamação, como a bradicinina, prostaglandina e a serotonina, agindo sobre a fosfolipase A2, portanto sobre o ácido araquidônico (CARVALHO, 1999; CALIXTO *et al.*, 2003). No presente trabalho, foi realizada a avaliação da atividade anti-quimiotática *in vitro* de duas frações (flavonóides e fenólicos totais) e comparadas com o extrato total (FARSKY, 1994). Através do ensaio *in vitro*, verificou-se que a fração dos fenólicos totais não apresentou atividade inibitória frente à migração leucocitária, quando comparada com o controle, enquanto que a fração flavonoídica apresentou atividade altamente significativa. Considerando que a fração flavonoídica de *Vaccinium ashei* e *Rubus* sp. apresenta como constituintes majoritários hiperosídeo, isoquercitrina, e quercitrina, sugere-se que a atividade demonstrada esteja relacionada a um possível sinergismo entre os compostos como foi previamente verificado por SUYENAGA (2002).

O interesse para o uso clínico de substâncias com atividade analgésica utilizadas para o tratamento de diferentes tipos de dor (de origem neurogênica ou inflamatória), vem aumentando consideravelmente. Vários modelos experimentais de nocicepção podem ser utilizados para estudar a atividade analgésica de extratos e compostos isolados. Esses modelos possuem características próprias que devem ser consideradas, tais como simplicidade, reprodutibilidade, validade dos resultados e a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos (DICKENSON, 1995).

Neste estudo, os animais tratados com o extrato de *Vaccinium ashei* e com o diclofenaco sódico, não apresentaram diferença significativa durante a primeira fase do teste de formalina sub-plantar (0-5 min) em relação ao grupo controle, ao contrário da morfina, que protegeu efetivamente os animais da dor. No entanto, durante a segunda fase (20-25 min), o grupo tratado com a dose de 6,4 mg/kg apresentou diferença significativa quando comparado ao grupo controle.

Entretanto, após tratamento crônico, todos os grupos tratados obtiveram resultados significativamente diferentes quando comparados ao controle. Isto sugere que o extrato de *Vaccinium ashei* apresentou ação antinociceptiva na dor de origem inflamatória, assim como o diclofenaco sódico (controle positivo).

Verificou-se também que os animais tratados com *Vaccinium ashei*, nas doses de 3,2 e 6,4 mg/kg apresentaram uma porcentagem de 27%, e 46% respectivamente, na inibição das contorções abdominais após o tratamento agudo, com relação ao grupo controle, e de 27% para ambas doses após a administração crônica. Houve um aumento do limiar de dor analisado através do teste de contorção abdominal em ambas as doses, demonstrando um alto efeito analgésico periférico do extrato de *Vaccinium ashei* comparável ao diclofenaco sódico.

No teste de *Hot-plate* verificou-se em cada tempo, que os animais tratados com *Vaccinium ashei* reagiram mais rapidamente ao estímulo térmico do que os controles. A análise em relação à analgesia central demonstrou que o extrato nas doses previamente mencionadas apresentou eficácia quando comparado aos grupos controles positivos, morfina e diclofenaco sódico.

No modelo da elevação da cauda (LE BARS *et al.*, 2001), o grupo de animais tratados de forma aguda com o extrato de *Vaccinium ashei* na dose de 6,4 mg/kg e morfina apresentaram um maior tempo de permanência da cauda sobre a fonte de calor, quando comparados ao grupo controle. Esta diferença foi observada a partir dos 30 min após a administração das drogas, permanecendo até o final do teste. Após tratamento crônico, somente os animais tratados com morfina e com a maior dose do extrato de *Vaccinium ashei* apresentaram diferenças significativas, desde o tempo zero, mantendo-se até o final do teste. Os animais que receberam diclofenaco sódico e extrato na dose menor não apresentaram diferenças significativas. O teste nos permitiu obter mais informações sobre a ação do extrato de *Vaccinium ashei*, uma vez que o reflexo de retirada da cauda é de integração medular. Além disso, os testes de *tail-flick* e placa quente nos permitem verificar o tempo de ação das doses estudadas. Em função dos resultados obtidos, podemos dizer que o início da ação do extrato ocorre a partir dos 30 minutos após a administração por via oral.

SUBARNAS e WAGNER (2000) observaram que o extrato de antocianos apresentou atividade antiinflamatória relacionado com a inibição da cicloxigenase e do TNF- α . O TNF- α é considerado uma citocina inflamatória primária, devido seu papel de iniciar a cascata de ativação de outras citocinas (IL-1 β , IL-6 e IL-8), sendo que o ponto final da cascata resulta na ativação da cicloxigenase-2 (COX-2) (SOMMER e KRESS, 2004). WANG e colaboradores (1999) analisaram a ação da cianidina isolada e observaram que esta apresenta atividade antiinflamatória comparável a diversos agentes antiinflamatórios não esteróides (NSAIDs) como naproxeno, ibuprofeno e aspirina (WANG *et al.*, 1999, 2000).

Outros polifenóis, presentes no extrato de *Vaccinium ashei* tais como o ácido clorogénico, quercitrina, hiperosídeo e a isoquercetrina, foi demonstrado que inibem a atividade das enzimas cyclooxygenase e lipoxigenase; ambas enzimas estão relacionadas com a liberação do ácido araquidônico, o iniciador da resposta inflamatório (MIDDLETON *et al.*, 2000; NIJVELDT *et al.*, 2001). Portanto, sugere-se que o mecanismo antinociceptivo do extrato de *Vaccinium ashei* esteja relacionado à inibição de síntese de prostaglandina, porém mecanismos centrais não podem ser excluídos. Corroborando desta forma o uso popular das frutas vermelhas em condições dolorosas e inflamatórias como a gota e artritis.

JOSEPH e colaboradores (1998, 1999, 2003) reportaram que a suplementação com frutas do vermelhas ricas em antocianos reverte os efeitos deletérios causados pela idade, e melhora a atividade locomotora em ratos velhos. Dentro deste contexto os mesmos autores reportaram que a suplementação com frutas do gênero *Vaccinium* exerce efeitos sobre a atividade dos receptores muscarínicos-colinérgicos, a proteína quinase (PKC), as proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), bem como na síntese de novas proteínas induzidas pela cascata de ativação AMPc/PKA/CREB (JOSEPH *et al.*, 2005). Estas moléculas, por sua vez, estão envolvidas na formação e consolidação da STM e da LTM, e também com a modulação da memória em diversas estruturas cerebrais (MICHEAU, 1999).

Em concordância com a literatura os resultados obtidos com os experimentos apresentados no capítulo 5 fornecem as evidências necessárias

para comprovar experimentalmente que a suplementação com o extrato de *Vaccinium ashei* facilita a memória de curta duração (STM) e de longa duração (LTM) em tarefas aversivas e não aversivas (esquiva inibitória e reconhecimento de objetos respectivamente). Neste trabalho, também foram avaliadas as memórias de referência e memória operacional (OLTON *et al.*, 1979), bem como o aprendizado espacial no labirinto radial de 8 braços. Os animais tratados por 30 dias com o extrato de *Vaccinium ashei*, apresentaram diferença significativa durante a primeira fase do teste, em relação ao grupo controle. Isto sugere que o extrato facilita o processo de aquisição da informação, porém não altera a memória de referência (SHUKITT-HALE *et al.*, 2004, 2006).

Em consonância com JOSEPH e colaboradores (1998, 1999) observamos um aumento na atividade locomotora em animais adultos tratados com o extrato de *Vaccinium ashei*. Nós sugerimos que o mecanismo de ação do extrato esteja relacionado a um efeito sobre o sistema nervoso periférico; porém, o mesmo não afeta o processo de habituação no campo aberto, pois ambos grupos (controle e tratado) não apresentam diferença significativa no decréscimo da atividade locomotora durante a sessão de teste.

Evidências recentes sugerem que certos flavonóides alteram as concentrações da enzima monoamino oxidase (MAO), e modulam a transmissão dopaminérgica e serotoninérgica em diferentes estruturas cerebrais de roedores (VIANA *et al.*, 2005). O sistema serotoninérgico, por sua vez, participa do processo de formação e conversão de STM a LTM via AMPc/PKA/CREB, e um aumento de sua atividade está relacionado com a diminuição dos níveis de ansiedade (DOS-REIS-LUNARDELLI *et al.*, 2007).

Após suplementação prolongada com o extrato de *Vaccinium ashei*, observamos um efeito ansiolítico na tarefa de labirinto em cruz elevado bem como um aumento nas concentrações de 5-HT no corpo estriado e hipocampo de ratos adultos; porém, não foram observadas diferenças significativas em outras regiões corticais, bem como nas quantidades de dopaminas (PELLOW *et al.*, 1985; RODGERS e COLE, 1994; STEFFEN, 1994). Estudos adicionais são necessários para esclarecer se a ação sobre o SNC de *Vaccinium ashei* ocorre diretamente

nos receptores serotoninérgicos, ou indiretamente via liberação de serotonina endógena. Desta forma, se considera plausível que a administração de *Vaccinium ashei* facilite o desempenho comportamental realçando as vias de sinalização neuronal.

De acordo com os resultados obtidos nestes experimentos, realizados para verificar a atividade protetora do extrato de *Vaccinium ashei*, é possível afirmar que os animais adultos tratados com o extrato na dose de 3,2 mg/kg apresentaram neuroproteção basal. Também foi possível observar que o pré-tratamento dos animais velhos com o extrato, foi capaz de reverter o dano *in vitro* promovido pela administração de H₂O₂ no córtex cerebral. Alguns estudos sugerem que esses efeitos poderiam estar relacionados com a formação de um complexo entre os antocianos e o DNA, estabilizando desta forma a molécula frente ao ataque oxidativo (BEATTIE *et al.*, 2005). A atividade do extrato pode ainda ser atribuída à ação sinérgica e aditiva dos compostos presentes no extrato, uma vez que nossos estudos fitoquímicos apontam a presença de vários compostos desconhecidos, além daqueles já identificados e isolados.

Entretanto, os resultados observados nos ratos velhos podem ser decorrentes de alterações na estrutura e nas propriedades físicas da membrana plasmática durante o processo de envelhecimento (incremento da rigidez), o qual provavelmente afeta a distribuição intracelular de antocianos (CANTUTI-CASTELVETRI *et al.*, 2005; SHUKITT-HALE *et al.*, 2008). Além disso, é provável que a origem celular determine o grau de sensibilidade frente ao estresse oxidativo, e tais diferenças intrínsecas poderiam explicar nossos resultados (BARTUS, 1990). Novos experimentos para elucidar os mecanismos envolvidos com esta atividade protetora deverão ser realizados, porém envolverão a padronização de novas metodologias e estudos *in vitro/in vivo* para confirmação dos resultados.

Em consonância com a literatura (JOSEPH *et al.*, 2005), os resultados obtidos no ensaio autobiográfico realizado mostraram que antocianos isolados por CLAE são capazes de inibir a atividade da enzima acetilcolinesterase *in vitro* (MARSTON *et al.*, 2002). Estes dados sugerem que este mecanismo poderia estar

relacionado indiretamente aos efeitos comportamentais observados neste trabalho, visto que há evidências de que o sistema colinérgico participa na modulação da resposta nociceptiva, bem como nos processos de memória e aprendizado (BARROS *et al.*, 2004a,b; 2005). Porém, outros ensaios *in vivo* e *in vitro* são necessários para corroborar os resultados.

Nos experimentos realizados *in vivo* neste estudo, observou-se também que a cianidina isolado a partir de *Rubus* sp. e administrada oralmente por 30 dias, apresentou atividade neuroprotetora significativa, quando avaliada pelo método de TBARS. Desta forma, foi demonstrado que a cianidina isolada é capaz de atravessar a barreira hematoencefálica, incorporar-se ao SNC, especificamente no hipocampo, e exercer efeito protetor. Contudo, estudos adicionais, principalmente de biologia molecular, são ainda necessários para a confirmação do mecanismo de ação desse composto.

Os resultados obtidos neste estudo reforçam a hipótese de que este extrato é dotado de importante atividade sobre o SNC, e que este efeito poderia estar relacionado, pelo menos em parte, com uma modulação direta ou indireta das vias de sinalização neuronal.

10.1 Considerações finais

Durante as últimas décadas a preocupação do consumidor em relação à qualidade dos alimentos cresceu significativamente, juntamente com a procura por alimentos funcionais ou componentes alimentares ativos fisiologicamente. Esses compostos são importantes desde o ponto de vista nutricional porque podem prevenir o aparecimento de doenças crônicas não-transmissíveis que são características da transição nutricional. Isto é a atual tendência em substituir o consumo de frutas e vegetais, que são ricos em compostos bioativos, por alimentos ricos em açúcares e lipídios, tais como doces e refrigerantes.

Em consonância com a literatura, os resultados deste estudo suportam a hipótese de que as frutas vermelhas estão dotadas de compostos bioativos que poderiam reduzir o risco de ocorrência de doenças, promovendo benefícios à

saúde além de aumentar a Qualidade de Vida, incluindo os desempenhos físico e cognitivo. Estes dados levam a concluir que o uso de frutas vermelhas como mirtilo e amora-preta deve ser incentivado na dieta diária por pessoas que possuem ou desejam prevenir doenças de fundo neurológico e outras doenças correlacionadas (figura 5).

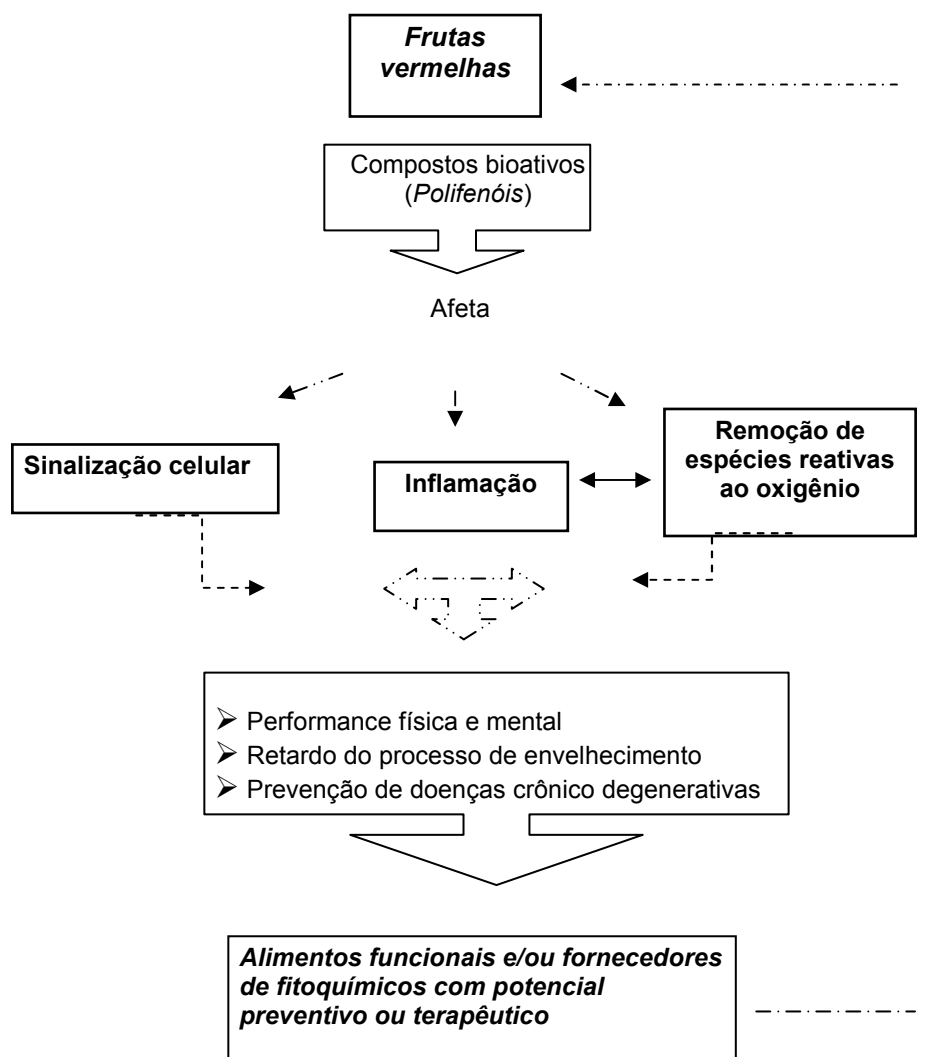


Figura 5. Efeito fisiológico da suplementação com mirtilo.

Tendo-se em vista que a informação quanto ao conteúdo de nutrientes e de outros componentes dos alimentos, é necessária para a construção de tabelas de alimentos com dados analíticos essencialmente nacionais e confiáveis, obtidos por metodologia apropriada. Cabe mencionar que dados fitoquímicos gerados nesta investigação serão utilizados para a elaboração da Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos (TBCA-USP, BRASILFOODS). Esse tipo de informação é essencial para o campo de nutrição, saúde e segurança alimentar como também para a economia por causa das exportações.

De modo geral, os estudos em laboratório têm fornecido significativas informações sobre os efeitos da dieta e a ocorrência de doenças e seus mecanismos de ação, entre tanto, resultados obtidos de estudos experimentais não podem ser relacionados diretamente para humanos, pois sofrem a extrapolação de resultados (diferenças entre as espécies podem invalidar as generalizações), e por tal motivo deveriam ser considerados como dados de apoio para suportar uma alegação.

Entretanto, nos estudos realizados em laboratórios pode-se adotar rigorosos controles, que servem como parâmetros para a comparação de resultados além de ser possível a avaliação de várias hipóteses, previamente estabelecidas sobre a ingestão de um alimento e sua capacidade de modificar fisiologicamente algumas funções do organismo.

Desse modo, nós podemos alegar que a utilização destas frutas vermelhas como alimentos funcionais e/ou como fornecedoras de fitoquímicos com potencial preventivo e terapêutico é promissora e poderá constituir uma mais-valia e uma fonte extra de rendimento para os agricultores que se dediquem ao cultivo destas espécies.

11 CONCLUSÕES

Após a análise dos resultados obtidos neste trabalho com *Vaccinium ashei* e *Rubus* sp., pode-se chegar às seguintes conclusões:

- A partir dos resultados obtidos para a validação de metodologia analítica empregada pode-se afirmar que os métodos cromatográficos propostos foram devidamente validados apresentando linearidade, precisão, exatidão, especificidade e robustez.

- Analisando-se o perfil cromatográfico de *Vaccinium ashei* pode-se verificar a presença de isoquercitrina, hiperosídeo e quercitrina, em *Rubus*, além destes compostos, foi detectada também a rutina.

- A partir da análise cromatográfica também foram caracterizadas cinco antocianidinas em *Vaccinium ashei*: delphinidina, cianidina, putunidina, peonidina e malvidina, sendo a cianidina a principal antocianidina identificada no gênero *Rubus*.

- Analisando-se os resultados de determinação de atividade antioxidante pode-se dizer que os extratos apresentaram uma atividade efetiva quando comparado ao padrão (Trolox). Pode verificar também, que as cultivares que apresentaram maior atividade foram aquelas com maiores teores de polifenóis totais, sugerindo uma influência destes compostos na atividade anti-radical livre das amostras, devido provavelmente a diferenças ambientais e genéticas.

- A atividade anti-quimiotática foi comprovada para a fração flavonóidica e é conseqüência dos compostos presentes na mesma.

- Os resultados do presente trabalho confirmam e estendem os dados descritos na literatura, demonstrando que o *Vaccinium ashei* apresenta importante ação antinociceptiva, tanto na nocicepção de origem neurogênica quanto inflamatória avaliada em camundongos. Estes dados nos levam a concluir que o

consumo de frutas vermelhas deve ser incentivado na dieta regular para aliviar a dor da artrite e a gota.

- Observou-se que a suplementação com o extrato de *Vaccinium ashei* facilita a STM e a LTM.

- Ao testar a atividade locomotora na tarefa de campo aberto foi observado que o extrato causa aumento da atividade locomotora em roedores.

- A partir dos resultados obtidos na tarefa de labirinto em cruz elevado pode-se afirmar que o extrato de *Vaccinium ashei* exerce um efeito ansiolítico em roedores. Sugerindo que o mesmo esteja relacionado com o aumento das concentrações de serotonina detectada no hipocampo e no corpo estriado de ratos.

- Analisando-se os resultados correspondentes ao ensaio cometa, pode-se dizer que o extrato total de *Vaccinium ashei* apresentou efeito neuroprotetor em camundongos e ratos (adultos e velhos).

- Ao testar-se a atividade anticolinesterásica constatou-se que os antocianos isolados por CLAE inibem a atividade da enzima *in vitro*.

- Pode-se ainda concluir que a cianidina isolada exerce atividade neuroprotetora (TBARS) por mecanismos ainda desconhecidos.

- Entretanto, não foram observadas diferenças nos ratos velhos com relação aos controles nas tarefas de esquiva inibitória, campo aberto, labirinto em cruz elevado, labirinto aquático de Morris, *Y maze*, TOSC e catecolaminas (dados não mostrados). Porém, estes animais começaram o tratamento com 18 meses de idade, sendo assim, parece razoável sugerir que quanto mais cedo se inicia a suplementação mais efetivo será o tratamento.

- Não foram observadas diferenças significativas no modelo de epilepsia, entre o grupo tratado e o grupo controle, assim como não foram detectadas alterações no sistema dopaminérgico em animais adultos.

- Os mecanismos envolvidos nas ações do extrato não estão ainda completamente esclarecidos, contudo foi demonstrado que a ação causada pelo extrato é particularmente interessante, tendo em vista que ele parece interagir com os sistemas opióide e serotoninérgico, e com a inibição da atividade de citocinas pró-inflamatórias e da enzima acetilcolinesterase. Neste sentido, foram obtidos avanços significativos acerca dos mecanismos de ação do *Vaccinium ashei*, o que torna o seu extrato e seus princípios ativos interessantes para o aproveitamento como AF.

- Considerando que a extração e a purificação de antioxidantes a partir de fontes naturais têm se tornado essencial para a utilização dessas substâncias na preparação de alimentos funcionais e como aditivos para produtos farmacêuticos, cosméticos e alimentícios. Uma maneira de agregar valor a estas frutas seria desenvolver um processo de extração desses compostos antioxidantes que pudesse ser transferido para micro e pequenas empresas das regiões produtoras.

REFERÊNCIAS

ABREU, E.S. **Elaboração e avaliação da eficácia do sistema de fontes de um instrumento de orientação alimentar como ferramenta para intervenções dietéticas em indivíduos hiperlipidêmicos**. São Paulo: Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, 2003 (Tese de doutorado).

ACNielsen. Wat's hot around the globe. **A global ACNielsen on line survey on consumer behaviour and attitudes**. Disponível em: www.acnielsen.com. Acesso em 5.8.2007.

ADEREM, A.; SMITH, K.D. A systems approach to dissecting immunity and inflammation. **Seminars in Immunology**, v.16, p.55-67, 2004.

ALICE, L.A. Evolutionary relationships in *Rubus* (Rosaceae) based on molecular data. **Acta Horticulture**, v.585, p.79-83, 2002.

ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v.100, p.40-56, 2004.

AMOROS, M.; SIMÕES, C.M.O.; GIRRE, L.; SAUVAGER, F.; CORMIER, M. Synergistic effect of flavones and flavonols against Herpes simplex virus type 1 in cell culture comparison with the antiviral activity of propolis. **Journal of Natural Products**, v.55, p.1732-1740, 1992.

ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research International**, v.35, p.171-176, 2002.

ANDRÉS-LACUEVA, C.; SHUKITT-HALE, B.; GALLI, R.L.; JAUREGUI, O.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M.; JOSEPH, J.A. Anthocyanins in aged blueberry-fed rats are found centrally and may enhance memory. **Nutrition Neuroscience**, v.8, p.111-120, 2005.

ANJO, D.L.C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v.3, p.145- 154, 2004.

ANMAT. **Los alimentos y las enfermedades Boletín para consumidores**, N° 18 y 19 unificados, Mayo, 2003.

ARAI, S.; MORINAGA, Y.; YOSHIKAWA, T.; ICHISHI, E.; KISO, Y.; YAMAZAKI, M.; MOROTOMI, M.; SHIMIZU, M.; KUWATA, T.; KAMINOGAWA, S. Recent Trends in Functional Food Science and the Industry in Japan. **Bioscience biotechnology and biochemistry**, v.66, p.2017-2029, 2002.

ARNAO, M.B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends Food Science Technology**, v.11, p.419-421, 2000.

ASHWHEL, M. **concepts of functional food ILSI Europe Monograph series**; ILSI Press, 2005.

ATOUI, A.K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, v.89, p.27-36, 2005.

BAGCHI, D.; PREUSS, H.G.; KEHRER, J.A. Nutraceutical and functional food industries: aspects on safety and regulatory requirements. **Toxicology Letters**, v.150, p.1-2, 2004.

BANSKOTA, A.H.; TEZUKA, Y.; PRASAIN, J.K.; MATSUSHIGE, K.; SAIKI, I.E.; KADOTA, S. Chemical constituents of Brazilian propolis and their cytotoxic activities. **Journal of Natural Products**, v.29, p.896-900, 1998.

BARNES, J.; ANDERSON, L.A.; PHILLIPSON, J.D. ST. John's worth (*Hypericum perforatum*): A review of chemistry, pharmacology and chemical properties. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.53, p.583-600, 2001.

BARREIROS, A.L.B.S.; DAVID, J.M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quimica Nova**, v.29, p.113-116, 2006.

BARROS, D.M.; IZQUIERDO, L.A.; MELLO E SOUZA T.; ARDENGHI, P.; PEREIRA, P.; MEDINA, J.H.; IZQUIERDO, I. Molecular signaling pathways in the cerebral cortex are required for retrieval of one-trial inhibitory avoidance learning in rats. **Behaviour Brain Research**, v.114, p.183-192, 2000.

BARROS, D.M.; CARLIS, V.; MAIDANA, M.; SILVA, E.S.; BAISCH A.L.; RAMIREZ, M.R.; IZQUIERDO, I. Interactions between anandamide-induced anterograde amnesia and post-training memory modulatory systems. **Brain Research**, v.30, p.66-71. 2004a.

BARROS, D.M.; RAMIREZ, M.R.; DOS REIS, E.A.; IZQUIERDO, I. Participation of hippocampal nicotinic receptors in acquisition, consolidation and retrieval of memory for one trial inhibitory avoidance in rats. **Neuroscience**, v.126, p.651-656, 2004b.

BARROS, D.M.; RAMIREZ, M.R.; IZQUIERDO, I. Modulation of working, short- and long-term memory by nicotinic receptors in the basolateral amygdala in rats. **Neurobiology Learning Memory**, v.83, p.113-118, 2005.

BARTUS, R.T. Drugs to treat age-related neurodegenerative problems: the final frontier of medical science? **Journal of the American Geriatrics Society**, v.38, p.680-695, 1990.

BAXENDALE, S. Amnesia in temporal lobectomy patients: historical perspective and review. **Seizure**, v.7, p.15-24, 1998.

BEATTIE, J.; CROZIER, A.; DUTHIE, G.G. Potential Health Benefits of Berries **Current Nutrition & Food Science**, v.1, p.71-86, 2005.

BENAVENTE-GARCIA, O.; CASTILLO, J.; LORENTE, J.; ORTUÑO, A.; DEL RIO, J.A. Antioxidant activity of phenolics extracted from *Olea europaea* L. leaves. **Food Chemistry**, v.68, p. 457-462, 1999.

BLAUT, M. Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. **European Journal of Nutrition**, v. 41, p.1-16, 2002.

BLOCH, A., THOMSON, C.A. Position of the American Dietetic Association: phytochemicals and functional foods. **Journal of the American Dietetic Association**, 95, 493-496, 1995.

BLOIS, M. S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v.181, p.1199-1200, 1958.

BOLDI, A. Libraries from natural products-like scaffolds. **Current Opinion in Chemical Biology**, v.8, p.281-286, 2004.

BONAN, C.D.; AMARAL, O.B.; ROCKENBACH, I.C.; WALZ, R.; BATTASTINI, A. M.; IZQUIERDO, I.; SARKIS, J.J. Altered ATP hydrolysis induced by pentylentetrazol kindling in rat brain synaptosomes. **Neurochemical Research**, v.25, p.775-9, 1999.

BONDY, S.C. The relation of oxidative stress and hyperexcitation to neurological disease. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.208, p.337-345, 1995.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.E; BERST, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v.28, p.25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 16, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. Brasília, 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 17, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Brasília, 1999b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999.** Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999.** Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Brasília, 1999d.

BRUNETON, J. **Phenols and Phenolic acids.** In BRUNETON, J. Pharmacognosy, phytochemistry and medical plants. Lavoisier Press. EUA. 211-227, 1995.

CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**, v.87, p.1-5, 2000.

CALIXTO, J.B.; OTUKI, M.F.; SANTOS, A.R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on Arachidonic Acid pathway, Nitric Oxide and Nuclear Factor kb (NF-KB). **Planta Medica**, v. 69, p.1-12, 2003.

CAMPOS, R.O.P.; HENRIQUES, M.G.M.O.; CALIXTO, J.B. Systemic treatment with *Mycobacterium bovis* bacillus calmette-guérin (BCG) potentiates kinin B1 receptor agonist-induced nociception and edema formation in the formalin test in mice. **Neuropeptides**, v.32, p.393-403, 1998.

CANDIDO, L.M.B.; CAMPOS, A.M. Alimentos funcionais. Uma revisão. **Boletim da SBCTA**, v.29, p.193-203, 2005.

CANTUTI-CASTELVETRI, I.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J.A. Neurobehavioral aspects of antioxidants in aging. **International Journal of Developmental Neuroscience**, v.18, p.367-381, 2000.

CARVALHO, J.C.; SERTIÉ, J.A.; BARBOSA, M.V.; PATRÍCIO, K.C.; CAPUTO, L.R.; SARTI, S.J.; FERREIRA, L.P.; BASTOS, J.K. Antiinflammatory activity of de crude extract from the fruits of *pterodon emarginatus* vog. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p.127-133, 1999.

CHOI, J.S.; YOKOZAWA, T.; OURA, H. Antihyperlipidemic effect of flavonoids from *Prunus davidiana*. **Journal of Natural Products**, v.54, p.218-224, 1991.

Codex alimentarius site: **http: www.codexalimentarius.net.** Acesso 10.7. 2005.

COOPENS, P.; SILVA, M.F.; PETTMAN, S. European regulations on nutraceuticals, dietary supplements and functional foods: a framework based on safety. **Toxicology**, v.221, p.59-74, 2006.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v.72, p.359-371, 2005.

CRAIG, A.D.; DOSTROVSKY, J.O. **Medulla to thalamus**. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. Textbook of pain. Churchill Livingstone : Londres, 1-8, 1999.

CRAIG, A.D. Pain mechanisms: Labeled lines versus convergence in central processing. **Annual Review of Neuroscience**, v.26, p.1-30, 2003.

D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.72, p.74-79, 1941.

DAUBENY, H.A.; BRAMBLES, I.N.; JANICK, J.E; MOORE, J.N. **Fruit breeding**, v. II, Vine and small fruits. John Wiley & Sons, EEUU, p.109-190, 1996.

DE LIMA, M.N.; LARANJA, D.C.; BROMBERG, E.; ROESLER, R.; SCHRODER, N. Pre- or post-training administration of the NMDA receptor blocker MK-801 impairs object recognition memory in rats. **Behaviour Brain Research**, v.156, p.139-143, 2005.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALÉE, F.; FLAHAUT M. Release of prostaglandins E and F in algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 61, p.17-24, 1980.

DE SOUZA, M.M. **Memórias de curta e longa duração: Mecanismos Independentes**. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2001 (Tese de doutorado).

DICKENSON, A. **Central Acute Pain Mechanisms**. Annals of medicine, v.27, p.223-227, 1995.

DICKENSON, A. **Mechanisms of central hypersensitivity**: excitatory amino acid mechanisms and their control. In: DICKENSON, A.; BESSON, J.M. The pharmacology of pain. Springer: Berlin, p.167-209, 1997.

DOS REIS-LUNARDELLI, E.A.; RAMIREZ, M.R.; CASTRO, C.C., COITINHO, A.S.; BAVARESCO, C.; DA TRINDADE, L.S.; PERRENOUD, M.F.; DE SOUZA, WYSE, A.T.; SARKIS, J.J.; IZQUIERDO, I. Effects of an Acute Treatment with L-Thyroxine on Memory, Habituation, Danger Avoidance, and on Na(+), K(+)-ATPase activity in Rat Brain. **Current Neurovascular Research**, v.4, p.259-67, 2007.

DOUGLASS, D.K.; CARSTENS, E. Responses of rat sacral spinal neurons to mechanical and noxious thermal stimulation of the tail. **Journal of Neuroscience**,

v.77, p.611-620, 1997.

DRAPER, H.H., HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. **Methods in Enzymology**, v.186, p.421–431, 1990.

DUFFY, K.B.; SPANGLER, E.L.; DEVAN, B.D.; GUO, Z.; BOWKER, J.L.; JANAS, A.M.; HAGEPANOS, A.; MINOR, R.K.; DECABO, R.; MOUTON, P.R.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J.A.; INGRAM, D.K. Blueberry-enriched diet provides cellular protection against oxidative stress and reduces a kainate-induced learning impairment in rats. **Neurobiology of aging**, 2007.

EICHENBAUM, H. LTP as memory model (1994) in Eichenbaum, H. Declarative memory: insights from cognitive neurobiology. **Annual Review of Psychology**, v.48, p. 547-572, 1997.

EICHENBAUM, H. The LTP-memory connection. **Nature**, v.378, p.131-132, 1993.
ECK, P. Botany In ECK, P; CHILDRES, N. Eds. **Blueberry Culture**, Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey, p. 14-44, 1966.

EMBRAPA/CLIMA TEMPERADO: **Arquivos e Cadernetas de Campo**, 2001.
FANTONE, J.C.; WARD, P.A. **Inflamação**. In: RUBIN, E.; FARBER, J. L. Patologia. Rio de Janeiro, Brasil: Guanabara Koogan, p.34-58, 1990.

FARSKY, S.H.P. **Influencia dos glicocorticoides endógenos sobre a interação leucócito-endotelio e sobre a capacidade de migração celular na inflamação**. Instituto de Ciências Biomédicas Universidade de São Paulo USP, 1994, Tese (Doutorado).

FERRARI, C.K.B.; TORRES, E.A.F.S. Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.57, p.251–260, 2003.

GALLETTA, G.J. **Blueberries and Cranberries** in ANICK, J.; MOORE, J.N. eds. *Advances in Fruit Breeding*, Purdue University Press, West Lafayette, Indiana, p.154-196, 1975.

GALLETTA, G.J.; BALLINGTON, J.R. **Blueberry, Cranberries and Lingonberries** in JANICK, J.; MOORE, J.N. eds. *Fruit Breeding Vol.II, Vine and Small Fruits*; John Wiley & Sons, Inc., New York, p.1-108, 1996,

GILROY, D.W.; LAWRENCE, T.; PERRETTI, M.; ROSSI, A.G. Inflammatory solution: new opportunities for drug discovery. **Nature Review**, v.3, p.104-416, 2004.

Guide for Validation of Analytical and Bioanalytical Methods. Resolution RE nº. 899, Brazilian Sanitary Surveillance Agency, Brasilia, Brazil, **2003**.

- GUTTERIDGE. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. **Clinical chemistry**, v. 41, p.1819-1828, 1995.
- HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free Radicals in Biology and Medicine**, 5th ed., Clarendon Press: Oxford, 1999.
- HALUSHKA, P.V.; MAYEUX, P.R.; MORINELLI, T.A. Thromboxane, prostaglandin and leukotriene receptors. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.10, p.213-239, 1989.
- HARDY, G. Nutraceuticals and functional foods: introduction and meaning. **Nutrition**, v.16, p.688–699, 2000.
- HASLAM, E.; Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v.59, p.205-209, 1996.
- HASLER, C.M., STAHLBERG, A.M., WEBB, D., HUNDNALL, M. How to evaluate the safety, efficacy and quality of functional foods and their ingredients. *Journal of the American dietetic association*, v.101, p.733-736, 2001.
- HAVSTEEN, B. Flavonoids, a class of natural products of high pharmacological potency. **Biochemical Pharmacology**, v.32, p.1141-1148, 1983.
- HAVSTEEN, B.H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids **Pharmacology & Therapeutics**, v.96, p.67– 202, 2002.
- HIGDON, J.V.; FREI, B. Tea catechins and polyphenols: health effects, metabolism, and antioxidant functions. **Critical reviews in food science and nutrition**, v.43, p.89-143, 2003.
- HOU, D.X. Potential mechanisms of cancer chemoprevention by anthocyanins. **Current Molecular Medicine**, v.3, p.149-159, 2003.
- HUNGENHOLTZ, J.; SMID, E.J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**, v.13, p.497-507, 2002.
- HUNT, S.P.; MANTYH, P.W. The molecular dynamics of pain control. **Nature Reviews Neuroscience**, v.2, p.83-91, 2001.
- IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Science**, v.69, p.2911-2919, 2001.
- International Conference on Harmonization (ICH); Guidance for industry Q2B: Text on Validation of Analytical Procedures**, November 1996.

IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M.B.C.; MEDINA, J.H. Neurotransmitter receptors involved in memory processing by the amygdala, hippocampus and medial septum of rats. **Behavioral and Neural Biology**, v.58, p.16–25, 1992.

JAMES, W. **The principles of Psychology**. Holt: New Yoek, 1980.

JANG, M.L. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. **Science**, v.275, p.218-220, 1997.

JENNINGS, D.L. **Raspberries and Blackberries**. In: Smartt, J.; Simmonds, N.W. Evolution of crop plants. 2 ed. Longman: Essex, p.531, 1995.

JONES, P.J. **Clinical nutrition**: 7. Functional foods — more than just nutrition JAMC, v.166, p.1555-1563, 2002.

JOSEPH, J.A.; SHUKITT-HALE, B.; DENISOVA, N.A.; PRIOR, R.L.; CAO, G.; MARTIN,A.; TAGLIALATELA, G.; BICKFORD, P.C. Long-Term dietary strawberry, spinach, or vitamin e supplementation retards the onset of age-related neuronal signal-transduction and cognitive behavioral deficits. **Journal of Neuroscience**, v.18, p.8047–8055, 1998.

JOSEPH, J.A.; SHUKITT-HALE, B.; DENISOVA, N.A.; BIELINSKI, D.; MARTIN, A.; MCEWEN, J.J.; BICKFORD, P.C. Reversals of Age-Related Declines in Neuronal Signal Transduction, Cognitive, and Motor Behavioral Deficits with Blueberry, Spinach, or Strawberry Dietary Supplementation. **Journal of Neuroscience**, v.19, p.8114–8121, 1999.

JOSEPH, J.A.; DENISOVA, N.A.; ARENDASH, G.; GORDON, M.; DIAMOND, D.; SHUKITT-HALE, B.; MORGAN, D. Blueberry supplementation enhances signaling and prevents behavioral deficits in an Alzheimer disease model. **Nutritional Neuroscience**, v.6, p.153-62, 2003.

JOSEPH, J.A.; SHUKITT-HALE, B.; CASADESUS, G. Reversing the deleterious effects of aging on neuronal comunication and behavior: beneficial properties of fruit polyphenolic compounds. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.81, p.313-316, 2005.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v.413, p.203-210, 2001.

KANDEL, E.R. **Essentials of Neural Science and Behaviour** Ed: Appleton & Lange USA, p.1227-1279, 2000.

KOWALCZYK, E.; KRZESIŃSKI, P.; KURA, M.; SZMIGIEL, B.; BASZCZYK

J. Anthocyanins In Medicine. **Polish Journal of Pharmacology**, v.55, p.699-702, 2003.

KRUGER, C.L.; MANN, S.W. Safety evaluation of functional ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, p.793-805, 2003.

KUSHI, L.H.; MEYER, K.A.; JACOBS, D.R. Jr. Cereals, legumes, and chronic disease risk reduction: evidence from epidemiologic studies. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.70 p.451S-458S, 1999.

KWAK, N.; JUKES, D.J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**, v.12, p.99-107, 2001a.

KWAK, N.; JUKES, D.J. Functional foods. Part 2: the impact on current regulatory terminology. **Food Control**, v.12, p.109-117, 2001b.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v.53, p.597-602, 2001.

LEVINE, J.D.; FIELDS, H.L.; BASBAUM, A.I. Peptides and the primary afferent nociceptor. **Journal of Neuroscience**, v.13, p.2273-2286, 1993.

LEVINE, J.D.; REICHLING, D.B. **Peripheral Mechanisms of Inflammatory Pain**. In: WALL, P.D.; MELZACK, R. Textbook of pain. Churchill Livingstone: Londres, 1-8, 1999.

LIN, HE, M.S.; FERNANDEZ, M.L. Saturated fat and simple carbohydrates elevate plasma LDL cholesterol concentrations by specific alterations on hepatic cholesterol metabolism. **Nutrition Research**, v.18, p.1003-1015, 1998.

LINARES, E.; MORTARA, R. A.; SANTOS, C. X.; YAMADA, A. T.; AUGUSTO, O.; Role of peroxynitrite in macrophage microbicidal mechanisms in vivo revealed by protein nitration and hydroxylation. **Free Radical Biology & Medicine**, v.30, p.1234, 2001.

LOPES, R.M.; OLIVEIRA, T.T.; DE, NAGEM, T.J.; PINTO, A.S. Flavonóides. **Biotechnologia ciência & desenvolvimento**, v.17, p.18-22, 2000.

MAFF site: <http://archive.food.gov.uk/maff.htm>. acceso 1.2. 2007.

MARSTON, A; KISSLING, J.; HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**, v.13, p.51-54, 2002.

MCGUIRE, S.O.; SORTWELL, C.E.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J.A.; HEJNA, M.J.; COLLIER, T.J. Dietary supplementation with blueberry extract improves

survival of transplanted dopamine neurons. **Nutritional Neuroscience**, v.9, p.251-258, 2006.

MELZACK, R.; LOESER, J.D. Pain: an overview. **Pain**, v.353, p.1607-1609, 1999.
MERSKEY, H. The definition of pain. **European Journal of Psychiatry**, v.6, p.153-159, 1991.

MICHEAU, J.; RIEDEL, G. Protein kinases: which one is the memory molecule? **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.55, p.534–548, 1999.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Review**, v.52, p.673–751, 2000.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v.57, p.161-164, 1999.

MILLS, E.; ERNST, E.; SINGH, R.; ROSS, C.; WILSON, K. Health food store recommendations: implications for breast cancer patients. **Breast Cancer Research**, v. 5 N°6, 2003.

MOORE, J.N.; SKIRVIN, R.M. **Blackberry Management**. In Galletta, G. J. e Himebrick, D.G.eds.Small Fruit Crop management. Prentice Hall, New Jersey, p.214-244, 1990.

MOREIRA, A.V.B.; MANCINI-FILHO, J. Influence of spices phenolic compounds on lipoperoxidation and lipid profile of rats tissues. **Revista de Nutrição**, v.17, p.411-424, 2004.

MORGADO, I. **Aprendizaje y Memoria**: conceptos, categorías y sistemas neurales. In: Neuroanatomía y fisiología de las funciones cerebrales. Ed. Madrileña, Cap. 32, p.827-873, 1999.

MUNRO, I.C. Soy isoflavones: A safety reviews. *Internacional Life Sciences Institute*. **Nutrition Reviews**, v.61, p.1-33, 2003.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food **Journal of chromatography A**, v.95, p.1054, 2004.

NAKAJIMA, J.; TANAKA, I.; SEO, S.; YAMAZAKI, M.; SAITO, K. LC/PDA/ESI-MS Profiling and Radical Scavenging Activity of Anthocyanins in Various Berries. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v.5, p.241–247, 2004.

NEUMANN, AICP; ABREU, ES; TORRES, E.A.F.S. Alimentos saudáveis, Alimentos funcionais, Fármaco-alimentos, Nutracêuticos... Você ouviu falar neles? **Higiene Alimentar**, v.14, p.19-23, 2002.

NEWMAN, D.J.; GRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as source of new drugs over a period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v.66, p.1022-1037, 2003.

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D.E.C.; BOELENS, P.G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P.A.M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.74, p.418-425, 2001.

NIKI, E. Antioxidant Activity: are we measuring it correctly? **Nutrition**, v.18, p.524-525, 2002.

NOONAN, W.P.; NOONAN, C. Legal requirements for "functional foods" claims. **Toxicology Letters**, v.150, p.19- 24, 2004.

OLTON, D. Mazes, maps and memory. **American Psychologist**, v.34, p.583-596, 1979.

OMONI, A.O.; ALUKO, R.E. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. **Trends Food Science and Technology**, v.16, p.344-348, 2005.

PASSAMONTI, A.S.; VRHOVSEKB, U.; VANZOA, A.; MATTIVIB, F. The stomach as a site for anthocyanins absorption from food. **FEBS Letters**, v.544, p.210-213, 2003.

PATIL, C.S.; SINGH, V.P.; SATYANARAYAN, O.S.; JAIN, N.K.; SINGH, A.; KULKARNI, S.K. Protective effect of flavonoids against aging- and lipopolysaccharide-induced cognitive impairment in mice. **Pharmacology**, v.69, p.59-67, 2003.

PELLOW, S.; CHOPIN, P.; FILE, S. E.; BRILEY, M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, p.149-176, 1985.

PETERSON, J.E.; DWYER, J. Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v.18, p.1995-2018, 1998.

PIMENTEL, B.M.V.; FRANCKI, M.; GOLLÜCKE, B.P. **Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Editora Varela, 2005.

POF site: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica>. **acesado 08.01. 2008**.

PRIOR, R.L.; CAO, G.; MARTIN, A.; SOFIC, E.; MCEWEN, J.; O'BRIEN, C.; LISCHNER, N.; EHLENFELDT, M.; KALT, W.; KREWER, G.; MAINLAND, M.

Antioxidant capacity as influenced by total phenolic and anthocyanin content, maturity, and variety of *Vaccinium* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.2686-2693, 1998.

RAINVILLE, P. Brain mechanisms of pain affect and pain modulation. **Current Opinion in Neurobiology**, v.12, p.195-204, 2002.

RAMON y CAJAL, S. **Histologie du Systeme Nerveux de l'homme et des Vertebres**. Paris, 1911.

RASEIRA, M.C.B.; SANTOS, A.M.; MADAIL, J.C.M. **Amora-preta: Cultivo e Utilização**. Circular técnica nº11, Embrapa, Centro Nacional de Pesquisa de Fruteiras de Clima Temperado, Pelotas, 20, 1994.

REITZ, R. **Flora Ilustrada Catarinense – Rosáceas**. Herbário Barbosa Rodrigues: Itajaí, 135, 1996.

RIBEIRO, E.P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de alimentos**. São Paulo: Editora Edgard Blucher: Instituto Mauá de Tecnologia, 2004. ISBN: 85-212-0326-8.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.E; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v.2, p.152-159, 1997.

ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v.34, p.105-110, 2002.

ROCHA e SILVA, M.O. **Brief History of Inflammation**. In Vane JR.; FERREIRA, S.H., Handbook of Experimental Pharmacology. New York: Springer-Verlag, p.6-5, 1978. In: VANE, J 2. ROCHE, A.K.; COOK, M.; WILCOX, G.L.; KAJANDER, K.C. A nitric oxide synthesis inhibitor (L-NAME) reduces licking behavior and Fos-labeling in the spinal cord of rats during formalin-induced inflammation. **Pain**, v.66, p.331-341, 1996.

RODGERS, R.J.; COLE, J.C. **Ethology and Psychopharmacology**. S.J. Cooper and C.A. Hendrie Editora, 1994.

ROSS, J. A.; KASUM, C.M.; **Annual Review of Nutrition**. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. V.22, p.19-34, 2002.

RUSSO, C.M.; BROSE, W.G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**, v.49, p.123-133, 1998.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p.1-16, 2006.

SELLAPPAN, S.; AKOH, C.; KREWER, G. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.2432-2438, 2002.

SHAMI, N.J.I.E.; MOREIRA, E.A.M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, v.17, p. 227-236, 2004.

SHAPIRO, M.L.; EICHENBAUM, H. Hippocampus as a memory map: synaptic plasticity and memory encoding by hippocampal neurons. **Hippocampus**, v.9, p.365–84, 1999.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammation response. Best practice & research. **Clinical Anaesthesiology**, v.18, p.385-405, 2004

SHUKITT-HALE, B.; MCEWEN, J.J.; SZPRENGIEL, A.; JOSEPH, J.A. Effect of age on the radial arm water maze: a test of spatial learning and memory. **Neurobiology of Aging**, v.25, p.223–9, 2004.

SHUKITT-HALE, B.; CAREY, A.; SIMON, L.; MARK, D.A.; JOSEPH, J.A. Effects of Concord grape juice on cognitive and motor deficits in aging. **Nutrition**, v.22, p.295-302, 2006.

SHUKITT-HALE, B.; LAU, F.C.; JOSEPH, J.A. Berry fruit supplementation and the aging brain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.13, p.636-641, 2008. SIMOPOULOS, A.P. Essential fatty acids in health and chronic disease. **American journal of clinical nutrition**, v.70, p.560S-569S, 1999.

SIRIWOHARN, T.; WROLSTAD, R.E.; FINN, C.E.; PEREIRA, C.R. Influence of Cultivar, Maturity, and Sampling on Blackberry (*Rubus* L. Hybrids) Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.8021-8030, 2004.

SMITH, D.L.; D'AMOUR, M.C.; D'AMOUR, F.E. Analgesic properties of certain drugs and drugs combination. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.77, p.184-193, 1943.

SOARES, S. E.; Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v.15, p.71-76, 2002.

SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hiperalgesia. **Neuroscience Letters**, v.361, p.184-187, 2004.

SOUZA, P.H.M.; SOUZA NETO, M.H.; MAIA, G.A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**, v.37, p.127-135, 2003.

SQUIRE, L.R.; ZOLA-MORGAN, S. The medial temporal lobe memory system. **Science**, v.253, p.1380-1386, 1991.

SQUIRE, L.R.; KANDEL, E.R. *Memory: Mind to Molecules*. New York: Sci Am Lib., 1999. STEFFEN, V. Estudio del efecto de la vitamina E, el selenio, el deprenilo y la acetil-carnitina sobre la acción tóxica del 1-metil-4-fenilpiridinio. Sevilla: Universidad de Sevilla. Facultad de Farmacia, Departamento de Bioquímica, Bromatología y Toxicología, 1994 (Tese de Doutorado).

STILES, W.C.; ABDALLA, D.A. **Harvesting, Processing and Storage**. In: ECK, P.; CHILDRES, N.eds. *Blueberry Culture*, Rutgers University Press, New Brunswick, New Jersey, p.14-44, 1996.

STINTZING, F.C.; STINTZING, A.S.; CARLE R.; WROLSTAD, R.E. A Novel Zwitterionic Anthocyanin from Evergreen Blackberry (*Rubus laciniatus* Willd.) **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.396-399, 2002.

SUBARNAS, A.; WAGNER, H. Analgesic and anti-inflammatory activity of the proanthocyanidin shelllegueain A from *Polypodium feei* METT. **Phytomedicine**, v.7, p.401-405, 2000.

SUYENAGA, E.S. **Avaliação da atividade antiinflamatória de flavonoides por ensaios in vivo e in vitro**. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2002 (Tese de doutorado).

TAIPINA, M.S.; FONTS, M.A.S.; COHEN, V.H. Alimentos funcionais – nutracêuticos. **Higiene Alimentar**, v.16, p.28-29, 2002.

THE BROOKS AND OLMO. **Register of Fruit and Nut Varieties**, 3ª edição, ASHS Press, Alexandria, VA, p.174-188, 1997.

TSUDA, T.; HORIO, F.; OSAWA, T. Cyanidin 3-O-beta-Dglucoside suppresses nitric oxide production during a zymosan treatment in rats. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v.48, p.305-310, 2002.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C.J.; TELSER, J.; Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.37, p.266, 2004.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Progress Neurobiology**, v.64, p.327-363, 2001.

VIANA, A.; REGO, J.C.; VON POSER, G.; FERRAZ, A.; HECKLER, A.P.; COSTENTIN, J.; RATES S.M.K. The antidepressant effect of *Hypericum caprifoliatum* Cham & Schlecht (Gutiferae) on forced swimming test result from an

inhibition of neuronal monoamino uptake. **Neuropharmacology**, v.49, p.1042-1052, 2005.

VITKOVIT, L.; BOCKAERT, J.; JACQUE, C. "Inflammatory" cytokines neuromodulators in normal brain? **Journal of Neurochemistry**, v.74, p.457-471, 2000.

WALZEM, R.L. Functional Foods. **Trends in Food Science and Technology**, v.15, p.518, 2004.

WANG, H.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M.; CHANG, Y.C.; BOOREN, A.M.; GRAY, J.I. Antioxidant and antiinflammatory activities of anthocyanins and their aglycon, cyanidin, from tart cherries. **Journal of Natural Products**, v.62, p.802-806, 1999.

WANG, H.; NAIR, M.G.; STRASBURG, G.M., BOOREN, A.M.; GRAY, I.; DEWITT, D.L. Cyclooxygenase active bioflavonoids from Balaton tart cherry and their structure activity relationships. **Phytomedicine**, v.7, p.15–19, 2000.

WANG, J.; MAZZA, G. Effects of anthocyanins and other phenolic compounds on the production of tumor necrosis factor α in LPS/NFN activated raw 264.7 macrophages. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 4183- 4189, 2002.

WIESELER-FRANK, J.; MAIER, S.F.; WATKINS, L.R. Glial activation and pathological pain. **Neurochemistry International**, v.45, p.386-395, 2004.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.80, p.300-308, 1944.

YETLEY, E.A. 1996. Accomplishments of the Keystone National Dialogue on Food, Nutrition, and Health. **ILSI Annual Meeting**, January. 23, 1996. Unpublished presentation.

YOU DIM, K.A.; DOBBIE, M.S.; KUHNLE, G.; PROTEGGENTE, A.R.; ABBOTT, N.J.; RICE-EVANS, C. Interaction between flavonoids and the blood–brain barrier: in vitro studies. **Journal of Neurochemistry**, v.85, p.180–192, 2003.

YOU DIM, K.A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J.A. Flavonoids And The Brain: Interactions At The Blood–Brain Barrier And Their Physiological Effects On The Central Nervous System. **Free Radical Biology & Medicine**, v.37, p.1683–1693, 2004.

ZHENG, W.; WANG, S. Antioxidant activity and phenolic composition in selected herbs. **Journal of agricultural and food chemistry**, v.49, p.5165-5170, 2001.

ANEXO

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATÉRIAS-PRIMAS FARMACÊUTICAS

Título: Análise química e avaliação das atividades biológicas e comportamentais de extratos de frutas ricas em compostos fenólicos (Mirtilo e Amora-Preta)

Doutoranda: MARIA ROSANA RAMIREZ

PARECER

Com relação a apresentação oral a docente Rosana relatou o trabalho de forma didática, clara e concisa. A parte escrita da tese merece adaptação quando a forma e ao conteúdo, sendo as discussões e sugestões dadas para a melhoria do trabalho. O trabalho apresentado contém resultados quantitativos relevantes tanto do ponto de vista fitoquímico quanto farmacológico e nutricional. De uma forma geral, levando-se em consideração o alcance dos objetivos propostos, os artigos já publicados e os que estão sendo publicados para publicações em de pouco tempo é possível a aprovação da tese e o reconhecimento do título de doutora com êxito.

Profa. Dr. Maria Terezinha Antunes
Porto Alegre, 18 de Agosto 2008.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATÉRIAS-PRIMAS
FARMACÊUTICAS

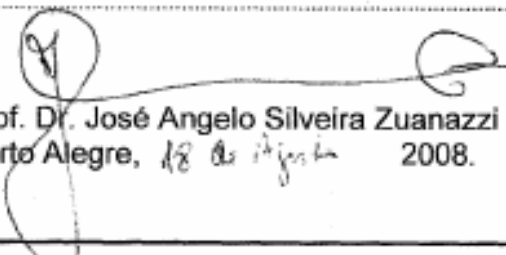
Título: Análise química e avaliação das atividades biológicas e comportamentais de extratos de frutas ricas em compostos fenólicos (Mirtilo e Amora-Preta)

Doutoranda: MARIA ROSANA RAMIREZ

PARECER

O trabalho está bem apresentado. A tese contém grande quantidade e boa qualidade de experimentos. A apresentação do trabalho foi muito boa, tendo sido a defesa bastante dedicada. Pequenas melhorias de forma e conteúdo foram apontadas no trabalho escrito. As referências bibliográficas, no geral, estão atualizadas e adequadas ao tema da tese.

Desta forma, posso recomendar favorável a obtenção do título de doutor.


Prof. Dr. José Angelo Silveira Zuanazzi
Porto Alegre, 18 de agosto 2008.

[versão 28JAN2005]

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Nível: Doutorado

Área de concentração: PESQUISA E DESENVOLVIMENTO DE MATÉRIAS-PRIMAS
FARMACÊUTICAS

Título: Análise química e avaliação das atividades biológicas e comportamentais de extratos de frutas ricas em compostos fenólicos (Mirtilo e Amora-Preta)

Doutoranda: MARIA ROSANA RAMIREZ

PARECER

A doutoranda realizou uma excelente apresentação oral de sua tese.

O trabalho está bem estruturado. Os resultados apresentados, assim como a discussão, conclusões, referências estão contemplando plenamente os objetivos propostos.

O estudo apresentou coerência, maturidade, dedicação e pesquisa por parte de pesquisadora.

Deve ressaltar as qualidades das técnicas empregadas na análise para obter os resultados encontrados. Entretanto, alguns pontos foram apresentados e deverão ser acrescentados. Pela qualidade e relevância do estudo, por favor, a aprovação da tese e do título de doutor conferindo-lhe o conceito "A".

Profa. Dr. Márcia Maria de Souza
Porto Alegre, 28/8 2008.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul analisou o projeto:

Número : 2004346

Título : Avaliação farmacológica de extratos vegetais contendo antocianosídeos sobre o aprendizado e memória em diferentes modelos animais

Pesquisador (es) :

<u>NOME</u>	<u>PARTICIPAÇÃO</u>	<u>EMAIL</u>	<u>FONE</u>
AMELIA TERESINHA HENRIQUES	PESQ RESPONSÁVEL	amelia@farmacia.ufrgs.br	33165313
DANIELA MARTI BARROS	PESQUISADOR	barrosdm@yahoo.com.br	

O mesmo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS, reunião nº 2 , ata nº 68 , de 09/03/2006 , por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, segunda-feira, 13 de março de 2006



LUIZ CARLOS BOMBASSARO
Coordenador do CEP-UFRGS

BIOGRAFIA

2001-2003 Bolsista de Mestrado/CNPq pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica. Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Rio Grande do Sul, (UFRGS). Sob orientação do Prof. Dr. Carlos Alexandre Netto e co-orientação da Profa. Dra. Vera Maria Treis Trindade.

2004-2008 Bolsista de Doutorado/CNPq pelo programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Faculdade de Farmácia, UFRGS. Sob orientação da Profa. Dra Amélia Teresinha Henriques e co-orientação da Profa. Dra Daniela Marti Barros.

Produção Científica resumida relacionada com o trabalho de doutorado

Influence of Cultivar, and Sampling on Anthocyanins, Polyphenolics, and Antioxidant Properties. Maria Rosana Ramirez, Amélia Teresinha Henriques. XVI Congresso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina “Carlo L. Spegazzini”, La Plata, Argentina, 2007.

Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cultivares de Rubus sp. Ramirez, M.R., Bassols Raseira, M.C., Henriques A.T. I Congresso Sul de Toxicologia Clínico-Laboratorial. TOXSUI, Porto Alegre, Brasil, 2008.

Efeito Neuroprotetor do Extrato de Vaccinium em Ratos Idosos Após Injúria Induzida com Peróxido de Hidrogênio. Maria Rosana Ramirez; Laura Geracitano; Daniela Martí Barros; Amélia Teresinha Henriques. 9^o Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, São Paulo, Brasil, 2007.

Perfil e Atividade Antioxidante de Diferentes Cultivares de Vaccinium Ashei Reade. Maria Rosana Ramirez; Maria Do Carmo Bassols Raseira; Amélia Teresinha

Henriques. 9^o Congresso Nacional da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição, São Paulo, Brasil, 2007.

Development and Validation of a High-Performance Liquid Chromatographic Method for Quantification of Anthocyanidins. Maria Rosana Ramirez, Ana Lucia Aboy, Amélia Teresinha Henriques, Maria Do Carmo Bassols Raseira. 31^a Reunião Brasileira de Química, Águas de Lindóia, Brasil.

Effects of Cyanidin 3-Glucoside on Neuroprotection in Rats. Maria Rosana Ramirez, Mariana Leivas Muller Hoff, Jose Claudio Fonseca Moreira, Amelia Teresinha Henriques. 31^a Reunião Brasileira de Química, Águas de Lindóia, Brasil.

Avaliação Nociceptiva do Extrato Polifenólico de Mirtilo Vaccinium sp em Camundongos. Maria Rosana Ramirez; Leandra Borba Guterres; Andressa Andrade; Ana Luiza Muccillo Baisch; Amélia Teresinha Henriques; Daniela Martí Barros. 14^o Congresso Latino-americano de Nutrição, 2006, Florianópolis, Brasil.

Inhibitory Effect of Flavonoids Fractions of Berries, on Chemotaxis Assay in Vitro. Maria Rosana Ramirez, Amelia Teresinha Henriques. XVI Congreso Italo-Latinoamericano de Etnomedicina "Carlo L. Spegazzini", La Plata, Argentina, 2007.

Efecto Neuroprotectivo de la Ingesta de Polifenoles en Ratones. Maria Rosana Ramirez; Laura Geracitano; Daniela Martí Barros; Amélia Teresinha Henriques. 14^o Congresso Latino-americano de Nutrição, 2006, Florianópolis, Brasil.

Estudio del Extracto Polifenólico de Vaccinium Berries Sobre la Memoria y Locomoción en Ratas Adultas. Maria Rosana Ramirez; Daniela Martí Barros; Amélia Teresinha Henriques. 14^o Congresso Latino-americano de Nutrição, Florianópolis, Brasil, 2006.

Efeito do Tratamento Prolongado com Extrato Total de Rubus Sp. no Sistema Nervoso Central de Ratos. Ramirez, M.R., Henriques A.T., Leivas, M.H.M., Fonseca, M.J.C. I Congresso Sul de Toxicologia Clinico-Laboratorial. TOXSUI, Porto Alegre, Brasil, 2008.