

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTICONVULSIVANTE DE SUCO
DE UVA BORDÔ E SEU EFEITO NO COMPORTAMENTO DE RATOS
WISTAR**

Adriana Dalpicolli Rodrigues

Caxias do Sul

2012

Adriana Dalpicolli Rodrigues

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTICONVULSIVANTE DE SUCO
DE UVA BORDÔ E SEU EFEITO NO COMPORTAMENTO DE RATOS
WISTAR**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Biotecnologia da Universidade de
Caxias do Sul, visando à obtenção do grau de
Mestre em Biotecnologia.**

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mirian Salvador

Co-orientador: Prof. Dr. João A. P. Henriques

Caxias do Sul

2012

ADRIANA DALPICOLLI RODRIGUES

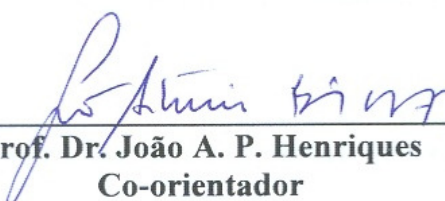
**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTICONVULSIVANTE E
COMPORTAMENTAL DE SUCO DE UVA BORDÔ, ORGÂNICO E
CONVENCIONAL, EM RATOS WISTAR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à
obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

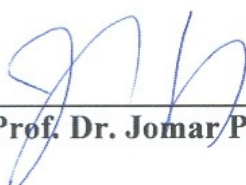
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 11 DE MAIO DE 2012.



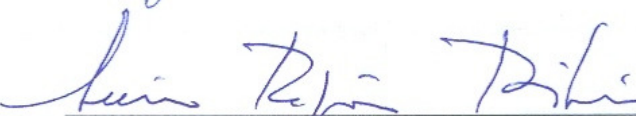
Prof. Dr.ª Mirian Salvador
Orientadora



Prof. Dr. João A. P. Henriques
Co-orientador



Prof. Dr. Jomar Pereira Laurino



Prof.ª Dr.ª Lúcia Regina Ribeiro



Prof.ª Dr.ª Cláudia da Silva Funchal

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Universidade de Caxias do Sul
UCS - BICE - Processamento Técnico

R696a Rodrigues, Adriana Dalpicolli

Atividade antioxidante e anticonvulsivante de suco de uva bordô
e seu efeito no comportamento de ratos Wistar / Adriana Dalpicolli
Rodrigues. - 2012.

99 f. : il. ; 30 cm.

Apresenta bibliografia.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul,
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2012.

“Orientação: Prof.^a Dr.^a Mirian Salvador.”

1. Suco de Uva – Anticonvulsivos. 2. Viticultura –
Antiepiléticos. 3. Antioxidação – Suco de Uva. 4. Biotecnologia. I.
Título.

CDU 2.ed.: 634.8.077:615.213

Índice para o catálogo sistemático:

1. Suco de Uva – Anticonvulsivos	634.8.077:615.213
2. Viticultura – Antiepiléticos	634.8:615.212
3. Antioxidação – Suco de Uva	542.943'78:634.8.077
4. Biotecnologia	60

Catalogação na fonte elaborada pelo bibliotecária
Ana Guimarães Pereira – CRB 10/1460

AGRADECIMENTOS

Ao final desse trabalho, gostaria de agradecer:

A minha orientadora Prof^a. Dr^a. Mirian Salvador por toda confiança, ensinamentos, exemplo profissional, estímulo, atenção e dedicação durante a realização desse trabalho.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. João A. P. Henriques pelos ensinamentos e auxílio para a realização do trabalho.

As professoras Adriana Simon Coitinho (UFRGS), Caroline Dani (Centro Universitário Metodista-IPA), Regina Vanderlinde (UCS), as alunas de iniciação científica do Centro Universitário Metodista-IPA Bruna Frank, Maitê dos Santos e Suzana de Freitas por todo auxílio prestado.

Aos queridos colegas e amigos do Laboratório de Estresse Oxidativo e Antioxidantes por todo auxílio na realização dos testes, ensinamentos e carinho durante todos os momentos ao longo do mestrado. Agradecimento especial a Gustavo Scola, Giovana Bortolini, Patrícia Spada, Thamiris Scheffel, Claire Chies, Fabiane Michelin, Carina Cassini, Ivana Giazzon, Gabriela Gambatto, Bárbara S. Costa, Joanna C. Anghinoni, Taís T. Pozzer, Jéssica Bevilaqua, Aline Cerbaro e Caroline Calloni.

A Universidade de Caxias do Sul, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, em especial a Lucimara Serafini, ao Laren e ao Centro Universitário Metodista-IPA pelo auxílio e apoio prestados.

Ao CNPq pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa.

As vinícolas AECIA e Perini pelo fornecimento das amostras de suco de uva.

Aos membros da comissão de acompanhamento, prof. Adriana Gower e prof. Jomar Laurino, e banca prof. Lúcia Ribeiro e Cláudia Funchal, pela disponibilidade e contribuições para as melhorias do trabalho.

A meus amigos, em especial a minha família e ao meu namorado Gustavo Cornelli, por estarem sempre ao meu lado, me ouvindo, apoiando, estimulando, torcendo por mim, entendendo meu estresse, ausência e auxiliando em todos os momentos durante o mestrado.

A todos que participaram de uma forma ou outra, muito obrigada!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
ABSTRACT	XI
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
2.1 Radicais Livres e Espécies Reativas	3
2.2 Antioxidantes	4
2.3 Estresse oxidativo.....	9
2.4 Suco de Uva	10
2.5 Epilepsia	15
3. OBJETIVOS	19
3.1 Objetivo Geral	19
3.2 Objetivos Específicos.....	19
4. RESULTADOS	20
4.1 CAPÍTULO 1	21
NEUROPROTECTIVE AND ANTICONVULSANT EFFECTS OF ORGANIC AND CONVENTIONAL PURPLE GRAPE JUICES ON SEIZURES IN WISTAR RATS INDUCED BY PENTYLENETETRAZOLE	21
4.2 CAPÍTULO 2	47
ORGANIC AND CONVENTIONAL PURPLE GRAPE JUICES PREVENT PENTYLENETETRAZOL INDUCED OXIDATIVE DAMAGE IN THE LIVER AND SERUM OF WISTAR RATS	47
5. DISCUSSÃO GERAL	66
6. CONCLUSÕES.....	74
7. PERSPECTIVAS.....	75
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

9. ANEXOS	87
ANEXO I: PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO CENTRO UNIVERSITÁRIO METODISTA DO IPA.....	88
ANEXO II	90
ANEXO III: CURRÍCULO LATTES	92

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Núcleo fundamental e diferentes classes dos flavonóides.....	8
Figura 2. Estrutura química dos principais monômeros de flavan-3-ols.....	12
Figura 3. Estrutura química dos principais dímeros de flavan-3-ols.....	12
Figura 4. Estrutura química das principais antocianinas.....	13
Figura 5. Estrutura química do ácido gálico e do resveratrol.....	14

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades antioxidante e anticonvulsivante apresentadas por diferentes compostos em modelos animais de epilepsia.....	73
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS

CAT	enzima catalase
DNA	ácido desoxirribonucléico
DNPH	dinitrofenilhidrazina
DTNB	5,5'-ditionitrobenzóico
ER	espécies reativas
GABA	ácido γ -aminobutírico
HO [•]	radical hidroxila
MDA	malondialdeído
NO [•]	óxido nítrico
¹ O ₂	oxigênio <i>singlet</i>
O ₂ ^{•-}	radical ânion superóxido
ONOO [•]	peroxinitrito
PTZ	pentilenotetrazol
RL	radicais livres
RO [•]	alcoxil
ROO [•]	peroxil
SOD	enzima superóxido dismutase
TBARS	ácido tiobarbitúrico

RESUMO

O suco de uva possui um importante papel econômico no Brasil, principalmente no estado do Rio Grande do Sul, grande produtor de uvas e derivados. Atualmente, podem ser encontrados sucos de uva orgânicos, em que o uso de agrotóxicos e engenharia genética no cultivo da uva são proibidos, e sucos convencionais, elaborados com uvas que recebem uma série de agroquímicos. Uma diferença significativa observada entre os dois tipos de suco é o conteúdo de compostos fenólicos, que é maior no suco orgânico. Esses compostos podem apresentar importante atividade antioxidante, minimizando a incidência de diversas doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como as neurodegenerativas, o câncer e a aterosclerose. A epilepsia é uma das doenças neurológicas mais comuns em todo o mundo e é caracterizada por crises convulsivas espontâneas e recorrentes. Essas crises podem aumentar o conteúdo de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, desequilibrando o metabolismo redox de pacientes epiléticos. Em vista disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante e anticonvulsivante de sucos de uva Bordô, orgânico e convencional, e seus efeitos no comportamento de ratos Wistar. Em adição, foi determinado o conteúdo de compostos fenólicos totais e compostos majoritários de cada suco. Para a realização do estudo, ratos Wistar machos (n=48) com 3 meses de idade pesando em torno de 250-300g foram divididos em 3 grupos e tratados, por gavagem, com solução salina, suco de uva orgânico ou convencional, durante 17 dias (tempo determinado de acordo com teste piloto). No 18º dia, as possíveis mudanças no comportamento (ansiedade, capacidade locomotora e exploratória) dos animais foram avaliadas pelo teste de Campo Aberto. A seguir, metade dos ratos de cada grupo recebeu uma dose única da droga convulsivante pentilenotetrazol (PTZ) e foram observados durante 30 minutos para avaliação das características convulsivas (tempo de latência para início da convulsão, tempo de convulsão tônico-clônica, tempo de convulsão

total, número de convulsões e número de animais que chegaram ao nível cinco da escala de Racine, o tipo mais severo de crise convulsiva). Avaliou-se, ainda, a taxa de mortalidade em cada grupo. A seguir, os animais foram eutanasiados por decapitação e as estruturas cerebrais (córtex cerebral, cerebelo e hipocampo), fígado e sangue foram coletados para avaliação do metabolismo redox (danos oxidativos a lipídios e proteínas, conteúdo de óxido nítrico, atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase e conteúdo de proteínas sulfidril). Os resultados mostraram que o tratamento com os sucos não alterou o comportamento dos ratos e não foi capaz de minimizar as convulsões induzidas por PTZ. Observou-se, no entanto, que o tratamento com suco convencional evitou a morte dos animais induzida por PTZ, enquanto que com o suco orgânico a mortalidade foi reduzida para 33%. Por outro lado, ambos os sucos evitaram os danos oxidativos a lipídios e proteínas, bem como o aumento no conteúdo de óxido nítrico no sistema nervoso central (SNC), fígado e soro dos ratos. Observou-se, ainda, que o tratamento com os sucos evitou a depleção de proteínas sulfidril em todos os tecidos estudados. O suco orgânico foi capaz de evitar, também, a depleção da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase em todos os tecidos. Já o suco convencional evitou a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes induzida por PTZ apenas no fígado e soro dos ratos tratados. Observou-se, ainda, que o suco orgânico apresentou maior concentração de compostos fenólicos totais, catequina, epicatequina, antocianinas, procianidina B1 e resveratrol do que o suco convencional, fator que pode ter influenciado nos resultados obtidos neste trabalho. Portanto, os resultados obtidos neste estudo abrem portas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêutica para o tratamento da epilepsia afim de aumentar a qualidade e a expectativa de vida de indivíduos portadores da doença, além de contribuir para o aumento do valor agregado do suco de uva, favorecendo a vitivinicultura nacional.

ABSTRACT

Grape juice has an important economic role in Brazil, mainly in the state of Rio Grande do Sul, a great important producer of grapes and its derivatives. Currently, it can be found organic grape juice, in which the use of pesticides and genetic engineering in grape cultivation are forbidden, and conventional juices obtained from grapes that receive a series of agrochemicals. A remarkable difference observed between the two types of juices is the content of phenolic compounds, which is higher in organic juice. These compounds have significant antioxidant activity, reducing the incidence of several diseases related to oxidative stress, such as neurodegenerative disorders, cancer and atherosclerosis. Epilepsy is a most common neurological disease worldwide and is characterized by spontaneous and recurrent seizures. These crises may increase the concentration of oxygen reactive species, unbalancing the redox metabolism of epileptic patients. Accordingly, the aim of this study was to evaluate the antioxidant, anticonvulsant and behavior activities of organic and conventional purple grape juices treatments in Wistar rats. In addition, it was determined the content of total and major phenolic compounds of each juice. For the study, male Wistar rats ($n = 48$), 3 months old, were divided into three groups and treated, by gavage, with saline, organic or conventional grape juice for 17 days (time determined by pilot testing). On the 18th day, the animals were evaluated by the open field test and the possible behavior changes (anxiety, locomotor and exploratory activities) are appointed. After that, half the animals in each group received a single dose of the convulsant drug pentylenetetrazole (PTZ) and they were observed for 30 minutes for evaluation of seizure characteristics (the latency to seizure, the tonic-clonic seizure time, the total seizure time, the number of seizure and how many animals reached the fifth stage on Racine's scale, the most severe type of seizure). It was also evaluated the mortality rate in each group. Then, the animals were euthanized by decapitation

according to the animal ethics protocols and the brain structures (hippocampus, cerebellum and cerebral cortex), liver and blood were collected to evaluate the redox metabolism (oxidative damage to lipids and proteins, the nitric oxide content, activity of the superoxide dismutase and catalase enzymes and proteins sulfhydryl content). The results showed that treatment with the juices did not change the behavior of rats and it was not able to minimize the PTZ-induced seizures. However, the treatment with conventional juice prevented the death of animals induced by PTZ, whereas with organic juice mortality was reduced to 33%. By the other hand, both juices prevented the oxidative damage to lipids and proteins, as well as increased the nitric oxide content in the central nervous system (CNS), liver and serum of rats. It was also observed that treatment with the juices prevented depletion of sulfhydryl proteins in all studied tissues. Organic juice was also able to prevent the reduction of the activity of antioxidant superoxide dismutase and catalase enzymes in all tissues. However, the conventional juice did not prevent the decrease in antioxidant enzyme activity induced by PTZ in the CNS of treated rats. Also, organic juice had a higher organic concentration of total phenolic compounds, catechin, epicatechin, anthocyanins, procyanidin B1 and resveratrol than conventional juice, a factor that may have influenced the results obtained in this work. Therefore, the results obtained in this study open possibility to the development of new therapeutic strategies for the treatment of epilepsy in order to increase the quality and expectancy life of epileptic individuals, and contribute to increasing the value of grape juice, favoring the wine country.

1. INTRODUÇÃO

O estado do Rio Grande do Sul é um importante produtor de uva e derivados, tendo elaborado 26,9 milhões de litros de suco de uva, em 2010 (Ribeiro de Mello, 2010). As variedades de uva utilizadas para elaboração dos sucos, tanto orgânicos quanto convencionais, são as americanas, ou seja, *Vitis labrusca*. Entre essas, a variedade Bordô tem sido bastante cultivada, já que é de fácil adaptação às condições de solo e de clima e uma das mais resistentes a doenças. Além disso, a uva Bordô é rica em antocianinas e que conferem cor e corpo aos sucos (Camargo & Nachtigal, 2007). Com a busca cada vez maior por uma dieta saudável, além dos sucos convencionais, vem crescendo, também, a produção de sucos orgânicos, ou seja, livres de agrotóxicos e de engenharia genética (IFOAM, 2011). Já foi relatado que os sucos de uva orgânicos apresentam maior conteúdo de compostos fenólicos (Dani *et al.*, 2007), os quais podem apresentar um efeito citológico antioxidante e, portanto capacidade de reduzir os danos oxidativos associados à incidência de doenças, como as neurodegenerativas, o câncer, a aterosclerose, entre outras (Halliwell & Gutteridge, 2007).

A epilepsia é uma desordem neurológica que afeta aproximadamente 1 a 2% da população mundial (WHO, 2011). Essa doença é caracterizada por duas ou mais crises convulsivas espontâneas e recorrentes (Harrison & Fauci, 2008). A recorrência das crises pode aumentar o conteúdo de espécies reativas no organismo, desequilibrando o metabolismo redox em pacientes epiléticos (Kutluhan *et al.*, 2009). Dessa forma, os pacientes tornam-se mais predispostos à ocorrência das doenças associadas ao estresse oxidativo.

Embora existam diversos medicamentos para tratamento da epilepsia, até o momento, não há cura e grande parte dos pacientes não responde às drogas (WHO, 2011). Em acréscimo, a medicação pode favorecer a produção de espécies reativas (Aycicek & Iscan, 2007) e a ocorrência de danos hepáticos (Ichai *et al.*, 2003).

Nos últimos anos, demonstrou-se que compostos fenólicos como a rutina (Nassiri-Asl *et al.*, 2008) e o resveratrol (Wu *et al.*, 2009) apresentam efeito anticonvulsivante em ratos Wistar. Considerando-se que sucos de uva são ricos em compostos fenólicos, o presente estudo teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante e anticonvulsivante de sucos de uva Bordô (orgânico e convencional) e seu efeito no comportamento de ratos Wistar. Os resultados obtidos poderão contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento de pacientes com epilepsia, além de aumentar o valor agregado do suco de uva, favorecendo a vitivinicultura nacional.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

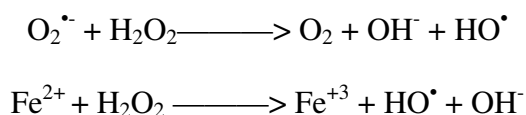
2.1 Radicais Livres e Espécies Reativas

Os radicais livres (RL) são espécies químicas (átomos ou moléculas) que possuem um elétron desemparelhado em sua camada mais externa. Devido a isso, reagem facilmente e rapidamente com outras moléculas com o objetivo de estabilizar o seu orbital de valência. Em nosso organismo são produzidos RL de oxigênio, nitrogênio, carbono e enxofre, tais como: radical ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), óxido nítrico (NO^{\bullet}), peroxinitrito ($ONOO^{\bullet}$), radical hidroxila (HO^{\bullet}), alcóxil (RO^{\bullet}), peróxil (ROO^{\bullet}), entre outros (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O termo “espécies reativas” (ER) é frequentemente empregado para incluir não apenas RL mas, também, compostos não radicalares capazes de gerar RL, como por exemplo, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o oxigênio *singlet* (1O_2), o ácido hipocloroso, e o ozônio. As ER que mais se destacam, devido a sua reatividade e danos causados, são as espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio (Halliwell & Gutteridge, 2007).

O $O_2^{\bullet-}$ é o radical mais comum e abundante nas células. É formado por reações de auto-oxidação de uma variedade de transportadores de elétrons ou por enzimas redox (Cardey *et al.*, 2007). Esse radical também é produzido pelas células fagocitárias (neutrófilos, monócitos e macrófagos) para defesa bactericida (Bylund *et al.*, 2010).

A espécie reativa H_2O_2 é produzida principalmente na matriz mitocondrial, durante o processo de redução do oxigênio ou pela dismutação do $O_2^{\bullet-}$ (Fridovich, 1998). Algumas bactérias também liberam H_2O_2 , o qual pode atravessar as camadas lipídicas das membranas biológicas do hospedeiro. Essa ER é um agente oxidante fraco, porém extremamente deletério por participar de reações como a de Haber-Weiss e de Fenton (Valko *et al.*, 2005), as quais geram o radical HO^{\bullet} em presença de metais como o ferro (Fe), conforme descrito a seguir:



Além disso, o H_2O_2 pode inativar enzimas por oxidação de grupos tiol (-SH) (Oga, 2003).

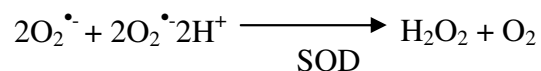
O NO^{\bullet} é um RL que reage rapidamente (tempo de meia vida de segundos) com outras espécies radicalares levando à geração de mais ER. A redução do NO^{\bullet} forma o ânion nitroxila e a oxidação desse gera o cátion nitrosônio, o qual é muito reativo e pode gerar o óxido nitroso e, possivelmente, o HO^{\bullet} . No entanto, a principal via metabólica do NO^{\bullet} envolve sua oxidação rápida a óxidos de nitrogênio superiores: nitrito e nitrato. Além disso, quando o NO^{\bullet} reage com o $\text{O}_2^{\bullet-}$ resulta em ONOO^{\bullet} que pode oxidar diversas classes de lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos (Halliwell & Gutteridge, 2007). A avaliação do conteúdo de óxido nítrico pode ser realizada em amostras biológicas de forma fácil e rápida, através da técnica em que há reação da amostra com o reagente de Griess. Esse ensaio é baseado em uma reação química de diazotação que usa sulfanilamida e naftiletlenodiamina, as quais, na presença de nitrito (principal produto da degradação de NO^{\bullet}), formam um sal de diazônio de coloração rosado que é medido espectrofotometricamente (Green *et al.*, 1981; Dawson & Dawson, 1995).

De forma geral, todas as ER podem ser produzidas por fontes endógenas ou exógenas. Dentre as fontes endógenas, encontram-se: a cadeia transportadora de elétrons mitocondrial, a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato oxidase e a atividade combinada da xantina oxidase e xantina desidrogenase. Dentre as fontes exógenas, podem-se citar compostos xenobióticos, exposições à radiação, fumo, drogas, entre outros (Halliwell & Gutteridge, 2007).

2.2 Antioxidantes

Os antioxidantes minimizam/evitam os processos óxido-redutivos desencadeados pelas ER. Esses compostos podem ser classificados em enzimáticos e não enzimáticos. O sistema de defesa enzimático é representado principalmente pelas enzimas superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT). Já o sistema não enzimático é constituído por vitaminas como o ácido ascórbico (vitamina C) e o α -tocoferol (vitamina E), além do ácido lipóico, das proteínas sulfidril, dos compostos fenólicos, entre outros (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Em células eucariotas aeróbicas, há várias isoformas da enzima SOD, geralmente ativadas em compartimentos celulares distintos (Fridovich, 1998; Blokhina *et al.*, 2003). A SOD1 ou SODCuZn, primeira a ser caracterizada, é um homodímero de cobre e zinco que se encontra quase que exclusivamente no espaço citoplasmático intracelular (Fridovich, 1998; Zelko *et al.*, 2002). A SOD2 ou SODMn é um tetrâmero que contém manganês em seu sítio ativo e na maioria dos animais e leveduras pode ser encontrada na mitocôndria (Fridovich, 1998). A SOD3 ou ECSOD, mais recentemente caracterizada, é um tetrâmero que contém cobre e zinco em seu sítio ativo e possui um peptídeo sinalizador que direciona essa enzima exclusivamente para o espaço extracelular (Zelko *et al.*, 2002). Independente do subtipo ou da sua localização, a enzima SOD é responsável por transformar os $O_2^{\bullet -}$ em H_2O_2 e oxigênio (O_2), conforme a reação a seguir (Fridovich, 1998):



O H_2O_2 é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, como a CAT ou a glutaciona peroxidase. A enzima CAT é uma ferrilhemoenzima cuja função principal é dismutar H_2O_2 formando água (H_2O) e oxigênio molecular, conforme a reação a seguir (Fridovich, 1998):



Essa enzima é um tetrâmero formado por unidades idênticas, sendo que cada monômero contém um grupo prostético heme no centro catalítico. Em animais, a CAT está presente nos eritrócitos e em praticamente todos os principais órgãos, encontrando-se, por exemplo, em maior concentração, no fígado e no rim e em menores quantidades no cérebro e coração (Halliwell & Gutteridge, 2007).

As atividades, tanto da SOD quanto da CAT, podem ser medidas utilizando-se técnicas espectrofotométricas indiretas. Uma das técnicas que mede a atividade da SOD está baseada na inibição do $O_2^{\bullet-}$ pela enzima presente na amostra, onde a mesma compete pelo $O_2^{\bullet-}$ com o sistema de detecção que utiliza adrenalina. A oxidação da adrenalina leva à formação de um composto colorido, o adrenocromo, que é detectado espectrofotometricamente (Bannister & Calabrese, 1987). A determinação da CAT baseia-se na medida da velocidade de consumo do H_2O_2 na amostra estudada. A decomposição do H_2O_2 é diretamente proporcional à atividade enzimática e obedece a uma cinética de pseudo-primeira ordem, sendo sua constante de velocidade calculada experimentalmente (Aebi, 1984).

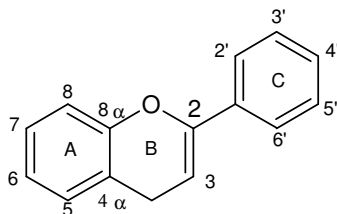
Dentre os antioxidantes não enzimáticos, as proteínas sulfidril são de grande importância. Muitas das proteínas presentes no organismo possuem resíduos de cisteína (com grupamentos sulfidril livres), que podem ser oxidados pela ação dos RL, desempenhando, portanto, um papel de proteção contra os danos oxidativos. A quantificação da concentração de grupamentos sulfidril pode ser realizada de forma fácil, rápida e irá fornecer uma ideia significativa do nível de ataque oxidativo a proteínas, ou seja, quanto maior o dano sofrido, menor é o conteúdo de proteínas sulfidril (Zoppi *et al.*, 2003). O método baseia-se na redução do ácido 5,5'-dinitrobenzóico (DTNB) por grupos tíóis, gerando um derivado amarelo que é mensurado espectrofotometricamente (Aksenov e Markesbery, 2001).

Os compostos fenólicos também fazem parte das defesas antioxidantes não enzimáticas. Esses compostos são definidos como substâncias que possuem um anel

aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003). De forma geral, eles podem ser classificados, de acordo com seu esqueleto principal, em flavonóides e não flavonóides (Ferguson, 2001). Os flavonóides apresentam uma estrutura hidrocarbonada do tipo C₆-C₃-C₆ (difetilpropano), derivada do ácido chiquímico e de três restos de acetato (Aron & Kennedy, 2008) e são divididos em diversas classes (flavona, flavonol, flavanona, flavan-3-ol, flavononol, antocianidina, chalcona, aurona) (Figura 1). Esses compostos são amplamente distribuídos no reino vegetal e, entre as frutas, a uva é a principal fonte (Kammerer *et al.*, 2004; Nicoletti *et al.*, 2008).

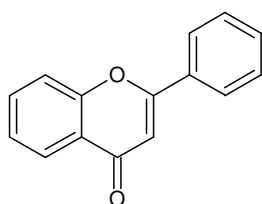
Em geral, atribui-se aos compostos fenólicos a capacidade de quelar metais e inibir a atuação do radical livre O₂[•] e do ¹O₂. Além de importantes antioxidantes, apresentam, também, atividades neuroprotetora, hepatoprotetora, antitrombótica, antiinflamatória, antiviral, antialérgica, anticancerígena, entre outras (Ferguson, 2001; Castilla *et al.*, 2006).

NÚCLEO FUNDAMENTAL DOS FLAVONÓIDES

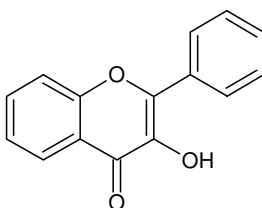


DIFERENTES CLASSES DE FLAVONÓIDES

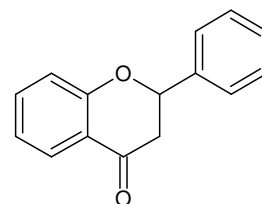
FLAVONA



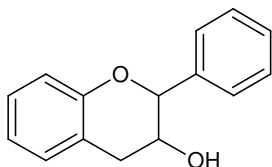
FLAVONOL



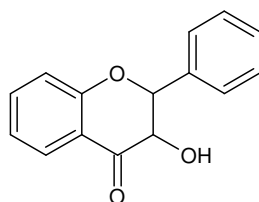
FLAVANONA



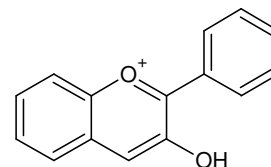
FLAVAN-3-OL



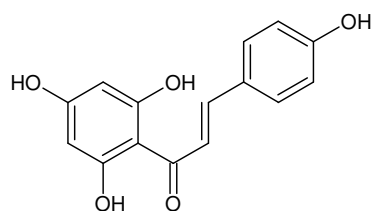
FLAVONONOL



ANTOCIANINA



CHALCONA



AURONA

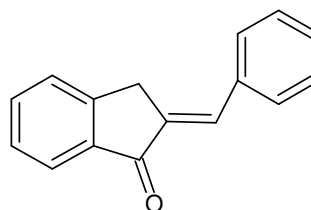


Figura 1. Núcleo fundamental e diferentes classes dos flavonóides (adaptado de Aron & Kennedy, 2008).

2.3 Estresse oxidativo

Em condições fisiológicas, as ER formam-se em proporções controladas pelos mecanismos defensivos celulares. Por outro lado, em situações patológicas, essa produção pode aumentar exageradamente e causar danos às células. Assim, a produção elevada de ER e/ou a deficiência nos sistemas de defesa antioxidante resulta em uma condição conhecida como estresse oxidativo, caracterizado por danos a lipídios, proteínas e ácidos nucleicos e, conseqüentemente, alterações na estrutura e no metabolismo das membranas celulares e das próprias células (Halliwell & Gutteridge, 2007). Quantidades aumentadas de metabólitos oxidativos têm sido detectadas em pacientes com uma variedade de doenças, tais como: doença de Parkinson, mal de Alzheimer, esclerose múltipla, câncer, *diabetes mellitus*, aterosclerose e cirrose (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Os lipídeos são alvos fáceis de ER e, normalmente, aparecem oxidados em condições de estresse oxidativo. Os danos nessas macromoléculas ocorrem através de reações em cadeia, iniciando com ataque de ER e provocando um aumento da permeabilidade da membrana celular para substâncias que normalmente não cruzam a bicamada lipídica, levando a inúmeros eventos intracelulares. Entre os produtos finais da peroxidação lipídica estão os compostos de baixo peso molecular, como hidrocarbonetos e aldeídos, por exemplo, o malondialdeído (MDA). O conteúdo de MDA formado pode lesar as proteínas e também reagir com o DNA causando danos oxidativos (Esterbauer & Cheeseman, 1990; Halliwell & Gutteridge, 2007). A determinação de ER ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) é o método mais antigo e utilizado para medir a peroxidação de ácidos graxos e membranas celulares, sendo um importante indicativo dos níveis de dano oxidativo lipídico. Esse método detecta não somente o MDA, mas também outros aldeídos produzidos na lipoperoxidação (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Os danos oxidativos a proteínas podem afetar a função de receptores, enzimas, anticorpos e proteínas de transporte. A carbonilação de proteínas pode ocorrer pela oxidação direta dos aminoácidos das cadeias laterais, pela interação das proteínas com produtos finais da peroxidação lipídica, como o 4-hidroxinonal e também através de reações de glicação (Chakravarti & Chakravarti, 2007). A reação dos grupos carbonílicos com a 2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH), formando 2,4-dinitrofenilhidrazona, tem sido bastante utilizada como método de avaliação do conteúdo de proteínas carboniladas (Levine *et al.*, 1990).

2.4 Suco de Uva

No Brasil, atualmente, a viticultura ocupa, aproximadamente, 80 mil hectares de área plantada, com vinhedos estabelecidos desde o extremo sul do país até regiões próximas ao Equador. A produção de uva nacional é da ordem de 1,3 milhões de toneladas/ano. Desse volume, cerca de 43% é destinado à elaboração de vinhos, sucos e outros derivados, e 57% comercializado como uvas de mesa (IBRAVIN, 2010; Ribeiro de Mello, 2010). O suco de uva é o principal derivado da uva a ser exportado (3098 toneladas no ano de 2010) (EMBRAPA, 2010).

Dos estados brasileiros, o Rio Grande do Sul é responsável por cerca de 90% da produção nacional de uva. Em 2010, foram produzidos no Estado, aproximadamente, 692.692 toneladas de uva e 26.887.259 de litros de suco de uva. Em relação aos anos anteriores, observou-se um aumento de 9,17% na produção e 24,51% na comercialização de suco de uva (Ribeiro de Mello, 2010).

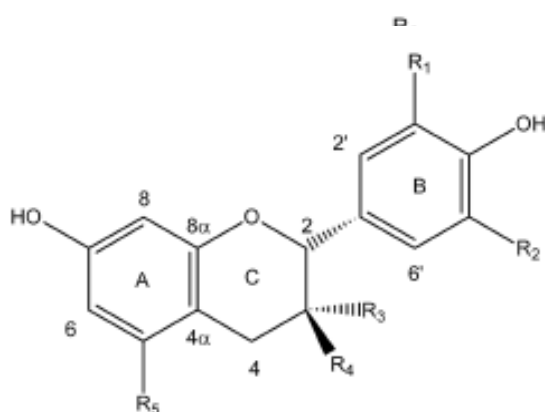
Segundo a legislação brasileira (Lei Federal N^o. 7.678, do Ministério da Agricultura, artigo 5^o, de 8 de novembro de 1988), suco de uva é a bebida não fermentada, obtida do mosto simples (esmagamento ou prensagem da uva), sulfitado (mosto simples estabilizado pela

adição de anidrido sulfuroso ou metabissulfito de potássio) ou concentrado (desidratação parcial de mosto não fermentado), de uva sã, fresca e madura (BRASIL, 2011).

No Brasil, principalmente no Rio Grande do Sul, o suco de uva é elaborado com uvas *Vitis labrusca* (americanas e híbridas), tintas (409.232.823 Kg de uvas processadas), sendo a Bordô (89.066.377 Kg de uvas processadas) uma das principais (EMBRAPA, 2010). A produção de uvas Bordô é de aproximadamente 15 a 20 toneladas por hectare (Camargo & Nachtigal, 2007) e vem aumentando em média 9,77% ao ano. Essa uva é de fácil adaptação à variabilidade das condições de solo e clima, pode ser cultivada sem porta-enxerto, é bastante produtiva, apresenta a maior rusticidade quanto aos aspectos fitossanitários (pragas, doenças e nematóides) quando comparada a outras variedades. Em adição, essa variedade é muito utilizada com o objetivo de corrigir a coloração de sucos elaborados com Isabel e Concord devido ao elevado teor de matéria corante (antocianinas) presente nas uvas Bordô (Rombaldi *et al.*, 2004; Camargo & Nachtigal, 2007).

Atualmente, podem ser encontrados sucos elaborados com uvas provenientes de vinhedos orgânicos, nos quais o uso de agrotóxicos e engenharia genética são proibidos ou convencionais, produzidos com uvas de vinhedos tradicionais que receberam tratamento com agrotóxicos ou foram modificados geneticamente (IFOAM, 2011). Geralmente, as plantas provindas da agricultura orgânica estão mais suscetíveis à ação de patógenos e fatores ambientais. Nessas condições de estresse, as plantas são estimuladas a produzirem metabólitos secundários, como os compostos fenólicos, com o objetivo de defender-se contra os agentes estressores a que estão expostas. Estudos têm mostrado que algumas frutas ou derivados de cultivares orgânicos podem apresentar maior conteúdo de compostos fenólicos do que os convencionais (Asami *et al.*, 2003; Lombardi-Boccia *et al.*, 2004, Dani *et al.*, 2007).

Os compostos fenólicos encontrados nos sucos de uva são os flavonóides e não-flavonóides (Ferguson, 2001), fundamentais na enologia devido às características direta ou indiretamente ligadas à qualidade do vinho e do suco, em relação à cor e adstringência (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2003; Rizzon & Link, 2006). Os flavonóides mais comuns dos sucos de uva são os monômeros (+)-catequina e (-)-epicatequina, e os dímeros de flavan-3-ols, como as procianidinas B-1 [(-)-epicatequina-(4 β →8)-(+)-catequina] e B-2 [(-)-epicatequina-(4 β →8)-(-)-epicatequina] (Dani *et al.*, 2007). As estruturas dos principais monômeros e dímeros de flavan-3-ols presentes no suco de uva estão apresentadas nas Figuras 2 e 3, respectivamente.



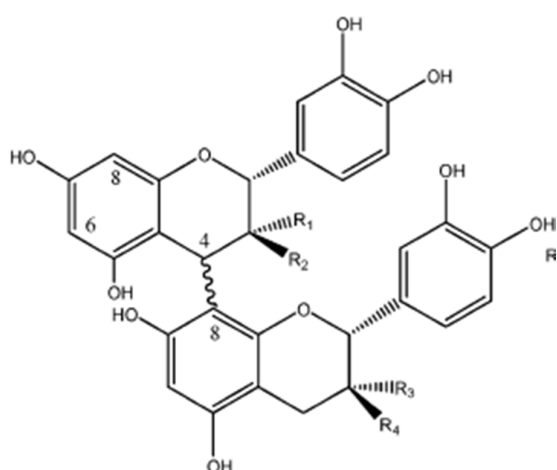
Monômeros de

	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	R ₅
flavan-3-ols					

(+)-catequina	H	OH	H	OH	OH
---------------	---	----	---	----	----

(-)-epicatequina	H	OH	OH	H	OH
------------------	---	----	----	---	----

Figura 2. Estrutura química dos principais monômeros de flavan-3-ols (Adaptado de Aron & Kennedy, 2008).



Dímeros de flavan-3-ols	R ₁	R ₂	R ₃	R ₄	
B1		OH	H	H	OH
B2		OH	H	OH	H

Figura 3. Estrutura química dos principais dímeros de flavan-3-ols (Adaptado de Weber *et al.*, 2007).

As antocianinas são as responsáveis pela maioria das cores azul, violeta e todas as tonalidades de vermelho, presentes em flores e frutos. Nas videiras, elas acumulam-se nas folhas durante a senescência e são responsáveis pela coloração das cascas das uvas tintas, sendo encontradas também na polpa de algumas variedades (Muñoz-Espada *et al.*, 2004). O diglicosídeo de malvidina, malvidina, cianidina, delphinidina e peonidina são alguns dos pigmentos antociânicos majoritários encontrados nos sucos de uvas. Entre esses compostos, o diglicosídeo de malvidina é encontrado em maior concentração nos sucos de uva Bordô (Dani *et al.*, 2007). As estruturas das principais antocianinas estão apresentadas na Figura 4.

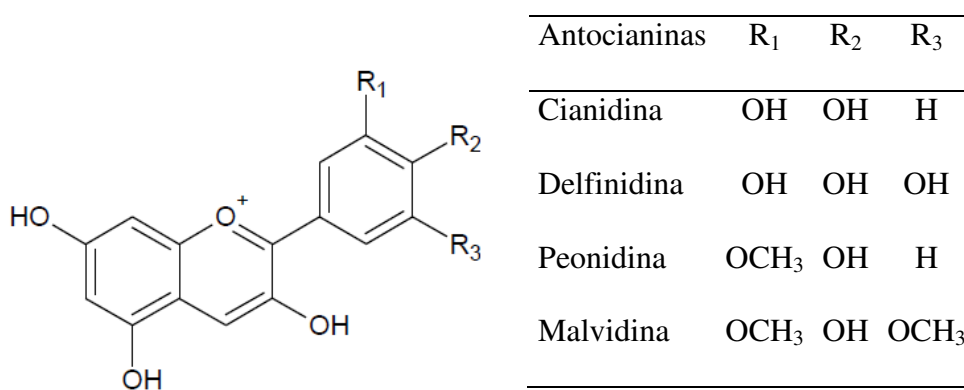


Figura 4. Estrutura química das principais antocianinas (Adaptado de Xia *et al.*, 2010).

Entre os compostos não-flavonóides presentes no suco de uva, pode-se citar os ácidos fenólicos (derivados dos ácidos benzóicos e cinâmicos) e os estilbenos. O ácido gálico (Figura 5A) é um ácido fenólico amplamente distribuído em plantas comestíveis e medicinais. Nas uvas, é encontrado principalmente nas sementes. Ele pode existir como uma única molécula ou como unidade estrutural de flavonóides hidrolisáveis. Esse composto apresenta atividade antioxidante, antiviral e antitumoral (Dong *et al.*, 2011). O resveratrol (Figura 5B), pertencente ao grupo dos estilbenos, é uma fitoalexina produzida em resposta ao estresse causado por ataque fúngico, dano mecânico ou condições de clima ou solo durante a produção do fruto pela planta. O resveratrol apresenta atividade antioxidante, antiaterogênica, apoptótica e de redução dos riscos de câncer (Soleas *et al.*, 1997).

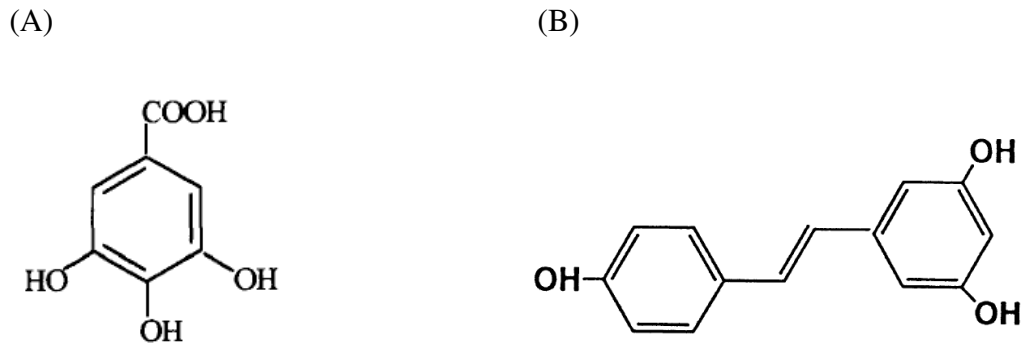


Figura 5. Estrutura química do ácido gálico (A) (Adaptado de Bhat *et al.* 1998) e do resveratrol (B) (Adaptado de Ferguson, 2001).

A quantificação dos compostos fenólicos totais pode ser realizada, espectrofotometricamente, segundo a técnica de Folin-Cicalteau (Singleton *et al.*, 1999). Os compostos fenólicos podem ser quantificados através de técnicas cromatográficas, onde é possível separar compostos em misturas pelas suas distribuições entre duas fases: a fase estacionária, que se caracteriza por um sólido ou um líquido suportado sobre um sólido; e a fase móvel (eluente), que pode ser um gás ou um líquido, que flui continuamente pela fase estacionária (Ferri, 1996). A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), que apresenta alta sensibilidade e seletividade, é muito utilizada na identificação e quantificação de flavonóides e não flavonóides em uma mistura líquida (Nuutila *et al.*, 2002). Nessa técnica, utiliza-se como fase móvel um líquido (solvente) e como fase estacionária partículas sólidas empacotadas em uma coluna. A separação dos compostos resulta das diferenças de velocidade dos componentes arrastados pela fase móvel, devido às diferentes interações com a fase estacionária. Os compostos podem ser identificados através dos tempos de retenção na fase estacionária, comparados com os padrões específicos (Falkenberg *et al.*, 2001).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado que o consumo diário de suco de uva pode reduzir a agregação plaquetária, regular a pressão sanguínea, diminuir os níveis de lipídeos

(colesterol, triglicerídeos, LDL) na circulação, reduzir os riscos de doenças cardiovasculares (para revisão ver Chong *et al.*, 2010) e proteger o DNA de danos oxidativos (Park *et al.*, 2003). Além disso, o suco de uva não possui álcool em sua composição, podendo ser consumido por crianças, gestantes, idosos, indivíduos que fazem uso de medicamentos ou em situações nas quais o consumo de álcool não é indicado.

2.5 Epilepsia

A epilepsia é uma das desordens neurológicas mais comuns e atinge cerca de 50 milhões de pessoas de todas as idades, sexos e etnias no mundo, sendo que a prevalência é maior em homens (WHO, 2011). A doença acaba envolvendo mais de 500 milhões de outros indivíduos, como os familiares e profissionais da saúde que atendem esses pacientes (Kale, 2002; Radhakrishnan, 2009), representando um ônus significativo para a saúde pública mundial (WHO, 2011).

A epilepsia é caracterizada pela ocorrência de duas ou mais crises convulsivas espontâneas, devido a alterações neuronais perpetuadas ao longo do tempo e evidenciadas por crises recorrentes (Harrison & Fauci *et al.*, 2008). A origem dessa doença pode ser genética ou esporádica, em consequência de diferentes tipos de danos cerebrais, como anomalias corticais congênitas, traumas, cisticercose, infecções, tumor cerebral, entre outros (López-Hernández *et al.*, 2005).

A fisiopatologia da epilepsia é caracterizada por alterações na despolarização da membrana neural, do meio iônico, da morfologia neural e das redes neuronais. Cada uma dessas alterações pode ser seguida por mudanças na liberação de neurotransmissores excitatórios e/ou inibitórios. De modo geral, observa-se um aumento na liberação de aminoácidos excitatórios (glutamato ou aspartato) e/ou na diminuição de neurotransmissores

inibitórios (ácido γ -aminobutírico - GABA), levando assim, a ocorrência das crises convulsivas (Mori *et al.*, 2004).

A descarga excessiva em um grupo de neurônios cerebrais pode ser local ou espalhar-se para outras áreas do cérebro com intensidade variável (López-Hernández *et al.*, 2005). Desse modo, muitas crises epiléticas podem manifestar-se através de alterações sensitivas, emocionais ou cognitivas dependendo do seu local de origem. A crise epilética mais dramática está associada à atividade hipersincrônica e repetitiva de um grupamento neural do sistema límbico, como as estruturas hipocâmpais e o córtex cerebral, a qual leva aos distúrbios de cognição ou consciência, movimentos involuntários, automatismos de comportamento ou manifestações autonômicas, sensoriais e psíquicas (Porto *et al.*, 2007). A epilepsia também pode levar a danos no cerebelo (Oyegbile *et al.*, 2011), estrutura que tem como função a coordenação motora e muscular (Hansen & Koeppen, 2002). As alterações no comportamento podem ser estudadas pelo teste de campo aberto, *open field*, um dos métodos mais utilizados e válidos para investigar aspectos comportamentais, como ansiedade, atividades exploratórias e locomotoras (Galani & Patel, 2010; Holzmann *et al.*, 2011).

O estresse oxidativo está sendo cada vez mais reconhecido como um fator associado à epilepsia (Costello & Delanty, 2004). O cérebro é extremamente suscetível ao dano oxidativo causado pelas ER, devido ao alto metabolismo aeróbico, a perfusão sanguínea, a concentração significativa de ácidos graxos poliinsaturados e, comparando com outros órgãos, possui um sistema de defesas antioxidantes deficiente (Yatin *et al.*, 2000; Bergamini *et al.*, 2004). Tal sistema de defesa deprimido é adequado em circunstâncias normais, no entanto, nas condições pró-oxidantes, como durante as convulsões, pode predispor ao estresse oxidativo (Militão *et al.*, 2010). Estudos têm mostrado que a recorrência das crises convulsivas pode aumentar o conteúdo de ER como o $O_2^{\cdot-}$, o HO^{\cdot} , o NO^{\cdot} e o H_2O_2 (Sudha *et al.*, 2001; Costello & Delanty, 2004; Kutluhan *et al.*, 2009). As ER são responsáveis pela indução de peroxidação de ácidos

graxos insaturados, componentes da membrana neural, o que pode levar a despolarização da mesma. Em cada crise epiléptica, ER são geradas, levando a danos oxidativos, e conseqüentemente, a ocorrência de mais crises, e isso acaba levando à formação de um ciclo vicioso (Mori *et al.*, 2004).

A epilepsia pode favorecer o desenvolvimento de outras doenças como a depressão, a ansiedade (Reilly *et al.*, 2011), transtornos psiquiátricos, problemas psicossociais e a morte súbita (Maldonado *et al.*, 2010). Essa doença aumenta o risco de morte prematura em cerca de 2 a 3 vezes em comparação com a população em geral (Maldonado *et al.*, 2010; WHO, 2011). Outra complicação relacionada às convulsões é a insuficiência hepática, a qual, embora seja rara, apresenta elevada taxa de mortalidade. Os mecanismos pelos quais a epilepsia leva a danos hepáticos são pouco definidos e parecem ser multifatoriais, incluindo o estresse (Akbas *et al.*, 2005).

Atualmente, um grande número de drogas anticonvulsivantes está disponível no mercado para o tratamento da epilepsia. Dentre elas, as mais utilizadas são: fenobarbital, difenildantoína, benzodiazepinas, etoxusimida, carbamazepina, valproato e vigatrina, gabapentina, felbamato, lamotrigina, topiramato, fosfenitoína, tiagabina, levetiracetam, zonisamida e oxcarbazepina (López-Hernández *et al.*, 2005). Entretanto, mesmo com a existência de diversos fármacos, até o momento, não há cura e nem ao menos tratamento com anticonvulsivantes que seja totalmente eficaz para os diferentes casos de epilepsia (López-Hernández *et al.*, 2005). Mais de 30% dos pacientes com a doença não respondem adequadamente ao tratamento, e os motivos do porquê isso acontece, são desconhecidos (Kwan & Brodie, 2000). Em adição, esses medicamentos podem gerar efeitos colaterais significativos, como as disfunções neuropsicológicas, psiquiátricas e hepáticas, distúrbios gastrointestinais, tontura, fadiga, sonolência, além de curta expectativa de vida (López-

Hernández *et al.*, 2005; Löscher & Potschka, 2005; Ochoa & Riche, 2011), indicando necessidade de desenvolvimento de novas alternativas para o tratamento.

Estudos têm demonstrado que compostos fenólicos como o flavonóide rutina (Nassiri-Asl *et al.*, 2008) e resveratrol (Wu *et al.*, 2009) apresentaram efeitos anticonvulsivantes em ratos Wistar. Em vista disso, neste trabalho estudou-se a possível atividade antioxidante e anticonvulsivante do suco de uva, um alimento rico em compostos fenólicos, em ratos Wistar tratados com pentilenotetrazol (PTZ), um convulsivante químico capaz de inibir os canais de cloreto, levar à diminuição da função dos receptores inibitórios de GABA e consequentemente às crises (White *et al.*, 2007).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante e anticonvulsivante de sucos de uva Bordô, orgânico e convencional, e seu efeito no comportamento de ratos Wistar. Além disso, foi estudado o conteúdo de compostos fenólicos desses sucos.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Caracterizar os sucos de uva Bordô, orgânico e convencional, quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais e majoritários.

3.2.2 Avaliar os parâmetros comportamentais (ansiedade, atividades locomotora e exploratória) de ratos Wistar (teste de campo aberto) tratados com os sucos de uva.

3.2.3 Estudar um possível efeito anticonvulsivante dos sucos de uva orgânico e convencional em modelo experimental de epilepsia induzido por pentilenotetrazol em ratos Wistar.

3.2.4 Quantificar a atividade antioxidante dos sucos de uva a nível tecidual (sistema nervoso central e fígado) e sérico de ratos Wistar tratados com PTZ.

4. RESULTADOS

Os resultados desse trabalho estão apresentados na forma de artigos científicos. O primeiro artigo foi aceito para publicação na revista *Neurochemistry International* e o segundo foi submetido na mesma revista.

4.1 CAPÍTULO 1

NEUROPROTECTIVE AND ANTICONVULSANT EFFECTS OF ORGANIC AND CONVENTIONAL PURPLE GRAPE JUICES ON SEIZURES IN WISTAR RATS INDUCED BY PENTYLENETETRAZOLE

Adriana Dalpicolli Rodrigues¹, Thamiris Becker Scheffel¹, Gustavo Scola¹, Maitê Telles dos Santos², Bruna Fank², Suzana Cesa Vieira de Freitas², Caroline Dani², Regina Vanderlinde¹, João Antonio Pegas Henriques¹, Adriana Simon Coitinho³, Mirian Salvador^{1*}.

¹ Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Centro Universitário Metodista –IPA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: 55 54 3218 2105 Fax: 55 54 3218 2664. E-mail address: msalvado@ucs.br (M. Salvador)

ABSTRACT

Epilepsy is the most common neurological disorder worldwide. Studies have shown that recurrent seizures may increase the concentration of reactive oxygen species, which can lead to oxidative stress and neuronal damage. These seizures result in substantial deleterious effects on an individual's health. Organic and conventional grape juices are rich in

polyphenols, compounds with important antioxidant activity. However, these juices could have differences in their polyphenol content. The aim of this study was to investigate the neuroprotective and anticonvulsant effects of organic and conventional grape juice treatments in Wistar rats against pentylenetetrazole (a convulsant drug)-induced damage. In addition, we evaluated potential behavioral changes in rats treated with the juices and the polyphenolic profile of those samples. Animals (n=16 in each group) received treatment with saline, organic or conventional grape juice for 17 days. On the eighteenth day, behavioral changes were evaluated by an open field test. Afterwards, half of the rats from each group received pentylenetetrazole and were observed for 30 minutes to evaluate possible seizure characteristics. The animals were subsequently killed by decapitation and their hippocampus, cerebellum and cerebral cortex tissues were isolated. The results of this study showed that neither organic nor conventional grape juice altered the behavior parameters, and no statistical differences were observed in the seizure characteristics of the groups. Nevertheless, both juice types were able to protect from lipid and protein oxidative damage, decrease nitric oxide content and increase enzymatic (superoxide dismutase and catalase) and non-enzymatic (sulfhydryl protein) antioxidant defenses in brain tissues following pentylenetetrazole-induced seizures. In general, organic juice showed superior results in each test, probably due to its higher polyphenol content relative to conventional juice. These results indicate that grape juices can provide further insight into natural neuroprotective compounds and may lead to the development of new therapeutic strategies for epileptic patients.

Keywords: neuroprotection, epilepsy, organic and conventional grape juice, polyphenols.

1. Introduction

According to the World Health Organization (WHO, 2011), epilepsy is one of the most common serious neurological conditions, affecting more than 50 million people worldwide. Seizures are caused by sudden, excessive and recurrent electrical discharges from brain cells. Studies have shown that recurrent seizures may increase the concentration of reactive oxygen species (ROS), including superoxide anions, hydroxyl radicals and hydrogen peroxide, in the brain (Sudha et al., 2001; Xu and Stringer, 2008). The generation of ROS can predispose the brain to oxidative stress, and, consequently, to neuronal damage (Costello and Delanty, 2004). This predisposition, in turn, can lead to higher rates of other conditions, such as depression, anxiety, psychiatric disorders (Reilly et al., 2011), psychosocial issues and sudden death. Epilepsy increases a person's risk of premature death by approximately two to three times compared to the general population (Maldonado et al., 2010; WHO, 2011). Despite the existence of a large number of antiepileptic drugs, there is currently no cure for epilepsy, and treatment is limited (Wahab, 2010). More than thirty percent of patients with epilepsy have inadequate control of their seizures by drug therapy, but why this happens and whether it can be predicted remain unknown (Kwan and Brodie, 2000). Furthermore, antiepileptic drugs are associated with a variety of side-effects and chronic toxicity (Silva et al., 2009).

In recent years, a great deal of attention has been devoted to the consumption of polyphenols. These phytochemicals have antioxidant effects that may protect the body against the oxidative damage caused by ROS. Therefore, polyphenols have been linked to reductions in the risk of major chronic diseases, such as Parkinson's, Alzheimer's and other neurodegenerative diseases (Halliwell and Gutteridge, 2007; Liu, 2003). Purple grape juice is a rich source of polyphenols, particularly anthocyanins, catechins and resveratrol (Dani et al., 2007). It is possible to find both organic (free of pesticides and genetic engineering) and

conventional (traditional cultivation) juices. It has been already shown that organic grape juice contains more phenolic compounds than does conventional juice (Dani et al., 2007).

Pentylentetrazole (PTZ) is the convulsant agent most commonly used in animal models for screening drugs for their potential anticonvulsant properties (Silva et al., 2009). The administration of this chemical convulsant leads to a decrease in γ -aminobutyric acid (GABA) function (inhibitory neurotransmission) and the stimulation and modification of either the density or sensitivity of different glutamate receptor subtypes (excitatory neurotransmission) (White et al., 2007). A growing body of evidence has suggested that ROS generation may underlie the neurotoxic effects of PTZ (Obay et al., 2008; Silva et al., 2009). In this context, the aim of the present study was to investigate the potential neuroprotective and anticonvulsant effects in Wistar rats of organic and conventional purple grape juice treatment against PTZ-induced damage. Furthermore, we evaluated the potential behavioral changes by an open field test of rats treated with the juices and measured the polyphenolic profile of these samples by liquid chromatography.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

Procyanidins B1 and B2, (+)-catechin, (-)-epicatechin, gallic acid, cyanidin-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, malvidin-3-diglucoside, malvidin-3-glucoside, trans-resveratrol, 2,4-dinitrophenylhydrazine, 5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid), thiobarbituric acid and pentylentetrazole were obtained from Sigma-Aldrich. All other reagents (Merck and Hexapur) and solvents (Nuclear) were of analytical grade.

2.2 Grape juices

The purple grape juice samples used in this study were from *Vitis labrusca* grapes, Bordo variety, harvested in 2009. The organic juice was obtained from the Cooperativa Aecia Agricultores Ecologistas Ltda. (Antonio Prado, RS, Brazil) and was certified by Rede de Agroecologia ECOVIDA, while the conventional juice was obtained from Vinícola Perini Ltda. (Farroupilha, RS, Brazil). The main characteristics of each grape juice are shown in Table 1.

Table 1
Main chemical characteristics of purple grape juices

	Organic grape juice	Conventional grape juice
Carbohydrates (%)	17.50±0.01	17.50±0.20
Lipids (%)	1.25±0.06	1.07±0.04
Proteins (%)	0.38±0.02	0.50±0.01*
Moisture (%)	87.20±0.01	85.70±0.05*
Ashes (%)	0.40±0.01	0.20±0.01*
Total acidity (% acid solution in molar)	8.40±0.01	8.20±0.01
pH	3.71±0.01	3.49±0.01*
Ascorbic acid (mg %)	45.34±1.16	26.71±1.17*

* Statistically different from organic grape juice.

The grape juice determinations were performed according to the Association of Official Analytical Chemists, 2005.

2.3 Animals and treatments

Forty-eight male Wistar rats (90 days old, weighing 250±50 g) from the breeding colony of the Centro Universitário Metodista were used in these experiments. The number of animals was determined by a statistical F test – MANOVA (F=3.21, $\alpha=0.05$, power=90%). The animals were handled under standard laboratory conditions consisting of a 12-hour light/dark cycle and fixed temperature (25±2 °C). Food and water were available *ad libitum*.

All experimental procedures were performed in accordance with the Brazilian Society of Neurosciences and Behavior. The study was approved by the Research Ethics Committee of the Centro Universitário Metodista IPA, number 298/2009. The animals were randomly assigned to one of three experimental groups (n=16 per group) as follows: group 1 served as control and received saline, while groups 2 and 3 were given, by gavage, organic or conventional grape juice (10 μ L/g of body weight), respectively, once a day over the course of 17 days. The doses of purple grape juice were determined by calculating the amount of juice consumed on average by a 70-kg human male, i.e., approximately 500 mL/day (Park et al., 2003).

2.4 Open field test

In order to assess if purple grape juices intake could alter the behavioral parameters, the treated rats were evaluated through the open field test. Anxiety, locomotion and exploratory activities were evaluated in the animals following the conclusion of the treatment (day 18). Experiments were carried out between 8:00 a.m. and 13:00 p.m. in a noise-free room. Rats were placed in a wooden box in which the floor was divided by black lines into 12 equal squares. Initially, the rats were placed in the middle of the quadrant and were allowed to explore the box freely for five minutes. The latency to start locomotion, the number of black line crossing, rearing, grooming and fecal bolus during exploration were measured and recorded manually (Holzmann et al., 2011; Galani and Patel, 2010).

2.5 Pentylenetetrazole (PTZ)-induced seizures

After the open field test, half of the rats from each group (n=8) received a single, intraperitoneal (i.p.) dose of PTZ (60 mg/kg of body weight) dissolved in sterile isotonic saline. This dose is between half of the effective dose to cause seizures (33 mg/kg) and the median lethal dose (75 mg/kg) (Ilhan et al., 2005). The other half of the rats (negative control) received saline solution (i.p.). The animals were observed for 30 min by a blind researcher, and the resulting seizures were classified according to the stages proposed by Racine (1972). We observed the latency to seizure onset, the tonic-clonic seizure time, the total seizure time, the number of seizures and how many seizures reached the fifth stage on Racine's scale (tonic-clonic seizures).

2.6 Neuroprotective effects of grape juice in brain tissues

Following the seizure tests, all animals, with or without PTZ treatment, were killed by decapitation. The hippocampus, cerebellum and cerebral cortex were isolated and stored at -80 °C. Prior to each assay, the tissues were homogenized in phosphate buffered saline (pH 7.4) using a ground-glass-type Potter-Elvehjem homogenizer and were centrifuged for five minutes. The supernatant was used in all assays. All processes were carried out under cold conditions.

To evaluate a possible neuroprotective effect of the juices, we measured the lipid and protein oxidative damage, the nitric oxide content and the enzymatic (superoxide dismutase and catalase) and non-enzymatic (sulfhydryl protein) antioxidant defenses. We used the formation of thiobarbituric acid-reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction as an index of lipid peroxidation, as previously described by Wills (1996). The results were expressed as nmol of malondialdehyde (MDA)/mg protein. The oxidative damage to proteins was assessed by the formation of carbonyl groups based on the reaction with

dinitrophenylhydrazine, as previously described by Levine et al. (1990). The results were expressed as nmol/mg of protein. Nitric oxide production was determined based on the Griess reaction (Green et al., 1981). Nitrite concentration was determined from a standard nitrite curve generated using sodium nitroprusside. The results were expressed as mg/mL of sodium nitroprusside/mg protein. Superoxide dismutase (SOD) activity was assayed by measuring the inhibition of adrenaline auto-oxidation, as previously described (Bannister and Calabrese, 1987), and the results were expressed as U SOD (units of enzyme activity)/mg of protein. One unit was defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation in 50%. Catalase (CAT) activity was assayed by measuring the rate of decrease in hydrogen peroxide (H₂O₂) absorbance at 240 nm, as previously described (Aebi, 1984), and the results were expressed as mmol H₂O₂/min/ mg of protein. The protein sulfhydryl content was evaluated by the 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) method (Aksenov and Markesbery, 2001), and the results are expressed as nmol DTNB/mg of protein. Protein concentration was measured by the Bradford method (1976) using bovine serum albumin as a standard.

2.7 Quantification of the phenolic compounds in the grape juices

The total phenolic content of the organic and conventional grape juices were measured using the modification of the Folin-Ciocalteu colorimetric method, as described by Singleton et al. (1999). Two hundred microliters of grape juice was assayed with 1000 µL of Folin-Ciocalteu reagent and 800 µL of sodium carbonate (7.5%, w/v). After 30 minutes, the absorbance was measured at 765 nm, and the results were expressed as mg/L catechin equivalent. High-performance liquid chromatography (HPLC) analysis was used to quantify the presence of individual phenolic compounds. Prior to the HPLC analysis, 1.5 mL of each

sample was filtered through a cellulose membrane (diameter 0.2 μm). The equipment used in the analysis consisted of an LC-DAD Series 1100 liquid chromatographic system (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA) with a diode array detector system.

The chromatographic analyses were a modification of the methods described by Lamuela-Raventós and Waterhouse (1994). A Zorbax SB C18 (250 x 4.6 mm), 5 μm particle size, with a flow of 0.5 mL/min, was used for the stationary phase. After filtration on a 0.2 μm Millipore membrane, five microliters of grape juice was injected into the HPLC system. The solvents used for the separation were as follows: solvent A (50 mM dihydrogen ammonium phosphate adjusted to pH 2.6 with orthophosphoric acid), solvent B (20% of solvent A with 80% acetonitrile) and solvent C (0.2 M orthophosphoric acid adjusted with ammonia to pH 1.5). The gradient conditions were as follows: solvent A 100% (0–5 min), solvents A 96% and B 4% (5–15 min), solvents A 92% and B 8% (15–25 min), solvents B 8% and C 92% (25–45 min), solvents B 30% and C 70% (45–50 min), solvents B 40% and C 60% (50–55 min), solvents B 80% and C 20% (55–60 min) and solvent A 100% (60–65 min). Chromatograms were monitored at 204 nm, and identification was based on the retention time relative to authentic standards ((+)-catechin, (-)-epicatechin, procyanidin B1, B2 and gallic acid). Quantification was performed using the standards by establishing calibration curves for each identified compound. Results are shown in mg/L. To determine cyanidin-3-glucoside, delphinidin-3-glucoside, peonidin-3-glucoside, malvidin-3-diglucoside and malvidin-3-glucoside, we used a mobile phase with solvents A (ultrapure water, formic acid, and acetonitrile) and B (ultrapure water, formic acid, and acetonitrile) in a constant flow of 0.8 mL/minute with a controlled temperature of 40 °C. The gradient conditions were as follows: solvents A 94% and B 6% (0 min), solvents A 70% and B 30% (0–15 min), solvents A 50% and B 50% (15–30 min), solvents A 40% and B 60% (30–35 min), solvents A 94% and B 6% (35–41 min). The peak was detected at 518 nm, and the amount of sample injected was 50 μL

(OENO, 2003). To quantify the resveratrol compound, we used a mobile phase of ultrapure water and acetonitrile (75:25 vol/vol) (pH 3.0) with a constant flow of 1.0 mL/min for 20 minutes with a controlled temperature of 25°C. The gradient conditions were as follows: solvents A 10% and B 90% (0 min), solvents A 85% and B 15% (0–23 min), solvents A 95% and B 5% (23–30 min), solvents A 10% and B 90% (30–35 min). The peak was detected at 385 nm, and the amount of sample injected was 20 µL (McMurtrey et al., 1994).

2.8 *Statistical analyses*

All measurements were performed in duplicate, at least. All values were presented as mean and standard error. The main chemical characteristics and phenolic compounds of organic and conventional grape juices were subjected to Student's t-test ($p \leq 0.05$). Other results were subjected to an analysis of variance (ANOVA) with Tukey's post hoc test. The SPSS 17.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL) was used for all statistical analyses.

3. Results

The results of the open field test showed that neither organic nor conventional grape juice altered the behavior parameters (latency for locomotion, total crossings, total rearings, grooming and fecal bolus) for any of the animals evaluated (Figure 1). Furthermore, neither juice type was able to prevent the convulsant effects induced by PTZ (latency of seizure time, tonic-clonic seizure time, total seizure time, number of seizures and number of seizures reaching stage five on Racine's scale) (Figure 2).

When compared to the saline group, organic and conventional grape juice treatments did not induce lipid or protein damage, nor did they increase nitric oxide content in the

hippocampus, cerebellum or cerebral cortex. In addition, neither of the juices induced a decrease in the antioxidant enzymes SOD or CAT or in the sulfhydryl protein content of any of the tissues compared to the saline group (Table 3, 4 and 5).

When compared to the saline group, pentylenetetrazole treatment induced an increase in lipid peroxidation (TBARS), protein damage (carbonyl protein content) and nitric oxide levels in all brain tissues. In addition, SOD and CAT activities and sulfhydryl protein were all reduced in the PTZ group for all of the tissues assayed (Tables 3, 4 and 5).

Treatment with organic or conventional grape juices attenuated the PTZ-induced oxidative damage to lipids and proteins and the increase in nitric oxide concentration in the hippocampus, cerebellum and cortex. In all tissues, the organic juice also inhibited the decrease in SOD and CAT activity induced by PTZ. Both juices prevented the reduction in sulfhydryl protein concentration that is typically induced by PTZ (Tables 3, 4 and 5).

Organic grape juice has a higher phenolic content compared to conventional juice (Table 2). Additionally, organic juice also shows higher concentrations of catechin, cyanidin, epicatechin, malvidin diglycoside, procyanidin B1 and resveratrol compared to conventional juice. The gallic acid and procyanidin B2 concentrations were higher in conventional grape juice (Table 2).

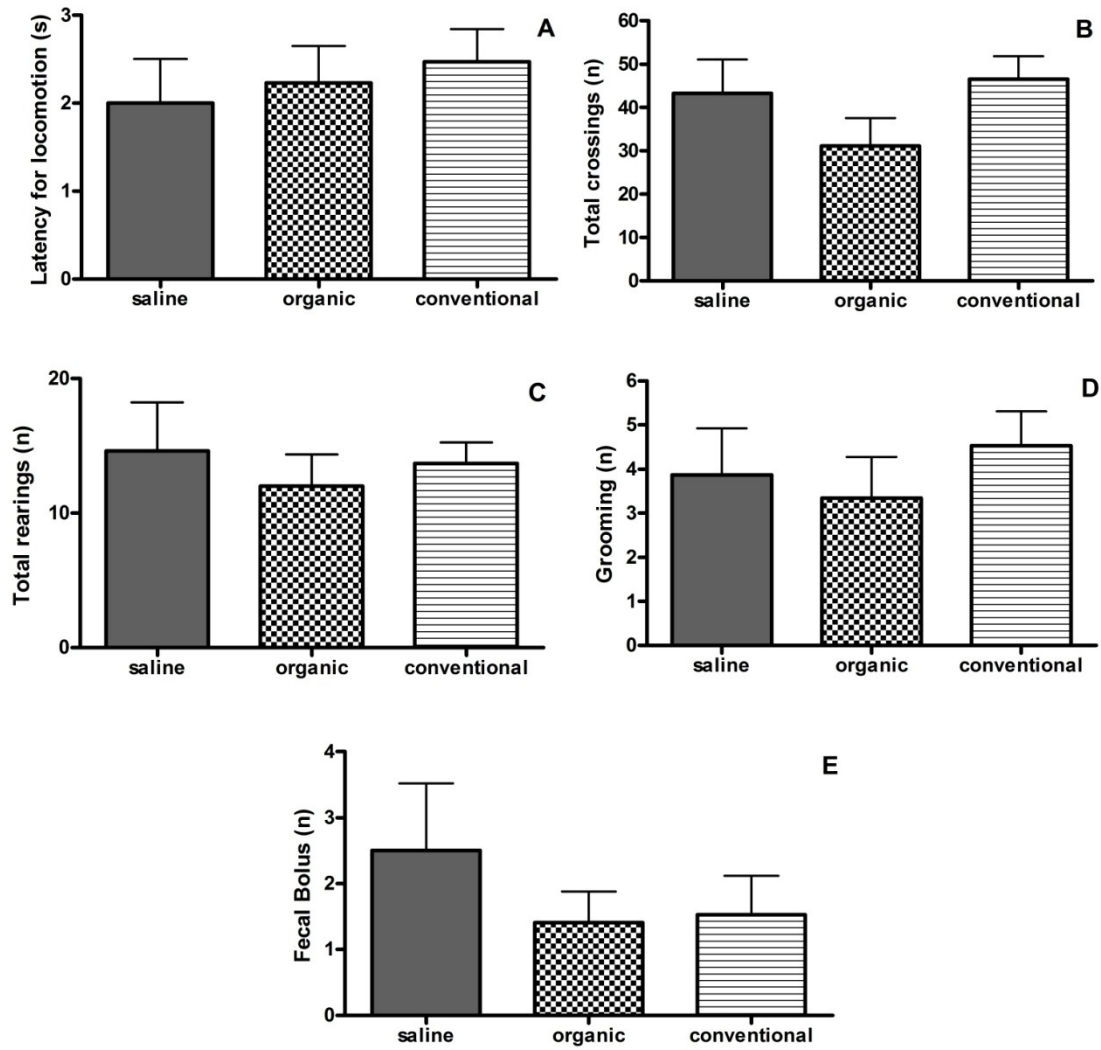


Figure 1. Effects of treatment on the behavior of Wistar rats with or without organic or conventional grape juices on A) the latency to start locomotion, B) the total crossings, C) rearings, D) grooming, E) fecal bolus.

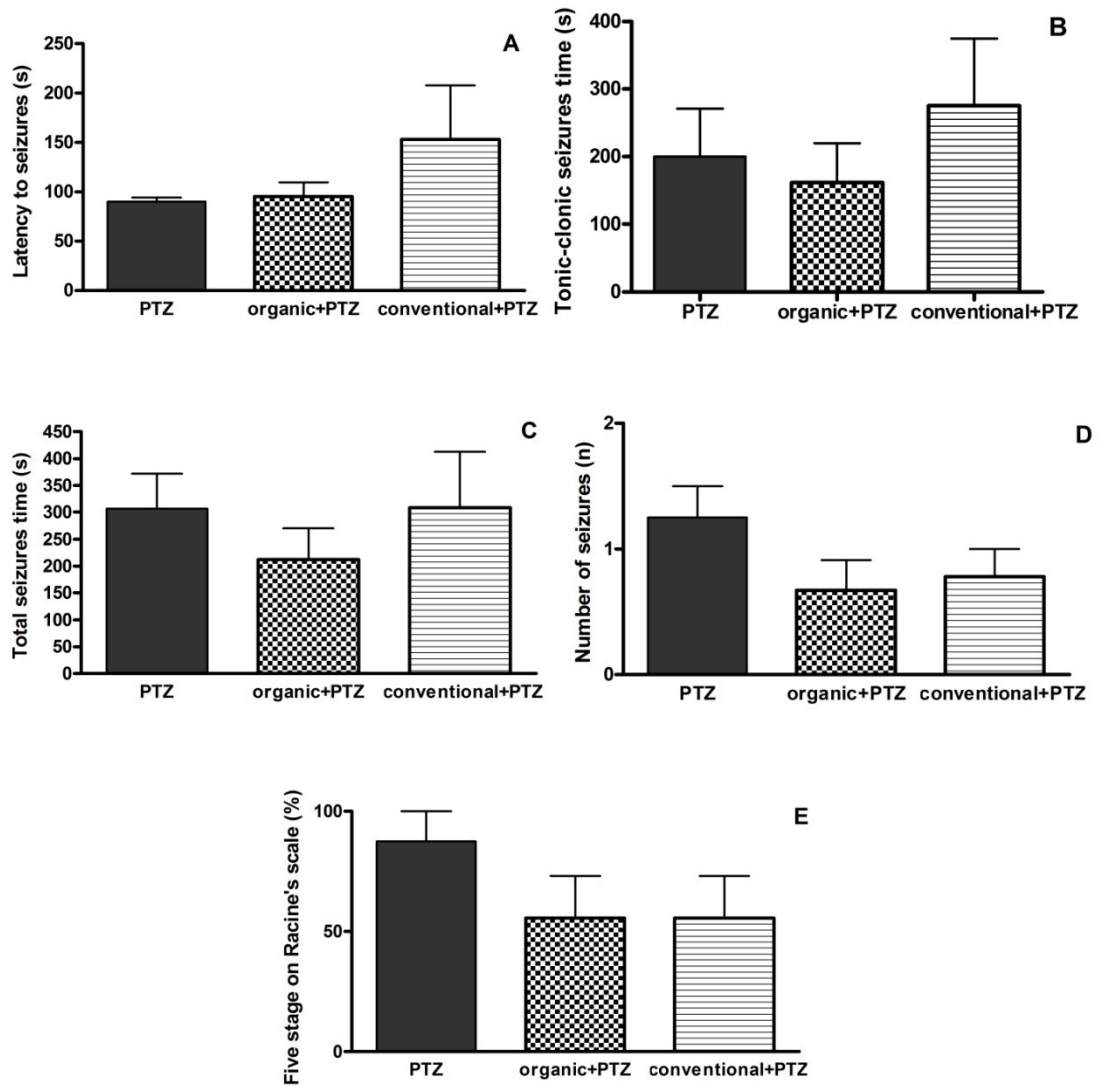


Figure 2. Effects of pentylenetetrazole treatment of Wistar rats with or without organic or conventional grape juice on A) the latency to seizure, B) tonic-clonic seizure time, C) total seizure time, D) number of seizures, E) percentage of rats that reached stage five on Racine's scale.

Table 2

Total phenolic content (mg catechin/%) and major phenolic compounds (mg/L) of organic and conventional purple grape juice.

	Organic grape juice	Conventional grape juice
Total phenolic compounds	146.32±1.01	125.76±1.71 [*]
Catechin	25.51±0.01	8.11±0.01 [*]
Cyanidin	33.61±0.06	25.44±0.03 [*]
Delphinidin	0.00±0.00	0.00±0.00
Epicatechin	8.17±0.01	5.95±0.01 [*]
Gallic acid	5.30±0.01	8.27±0.01 [*]
Malvidin	0.00±0.00	0.00±0.00
Malvidin diglycoside	316.15±0.41	229.59±0.32 [*]
Peonidin	0.00±0.00	0.00±0.00
Procyanidin B1	7.53±0.18	6.78±0.16 [*]
Procyanidin B2	6.94±0.13	8.43±0.11 [*]
Resveratrol	0.224±0.41	0.145±0.01 [*]

^{*} Statistically different from organic grape juice.

Table 3: Determination of thiobarbituric acid reacting substances (TBARS), carbonyl protein, nitric oxide content, superoxide dismutase and catalase activities and sulfhydryl protein content in the hippocampus of Wistar rats following pentylenetetrazole-induced seizures with or without organic or conventional grape juices.

Groups	TBARS (nmol MDA/mg of protein)	Carbonyl protein (nmol/mg of protein)	Nitric oxide content (mg/mL of sodium nitroprusside/mg protein)	Superoxide dismutase (U SOD/mg of protein)	Catalase (mmol H ₂ O ₂ /min/ mg of protein)	Sulfhydryl protein content (nmol DTNB/mg of protein)
Control (saline)	0,37±0,01 ^{a,c}	1,64±0,24 ^a	1,44±0,03 ^{a,c}	56,06±3,81 ^{a,c}	10,90±1,09 ^{a,c}	0,24±0,01 ^{a,c}
PTZ (60 mg/kg)	1,88±0,15 ^b	3,03±0,24 ^b	4,28±0,20 ^b	32,50±0,46 ^b	4,81±0,49 ^b	0,05±0,01 ^b
Organic grape juice (10 µL/g)	0,36±0,04 ^{a,c}	1,48±0,06 ^a	1,45±0,11 ^{a,c}	54,50±7,04 ^a	15,30±1,71 ^c	0,21±0,01 ^c
Organic grape juice + PTZ	0,43±0,03 ^{a,c}	1,45±0,33 ^a	1,99±0,09 ^c	55,10±2,64 ^{a,c}	14,42±1,64 ^c	0,11±0,01 ^d
Conventional grape juice (10 µL/g)	0,56±0,02 ^c	1,34±0,31 ^a	0,87±0,06 ^a	68,91±6,00 ^c	14,07±1,25 ^c	0,28±0,03 ^a
Conventional grape juice + PTZ	0,26±0,01 ^a	1,48±0,16 ^a	0,80±0,03 ^a	45,20±7,29 ^{a,b}	7,13±0,43 ^{a,b}	0,14±0,01 ^d

Different letters indicate a statistically significant difference for each parameter evaluated.

Table 4: Determination of thiobarbituric acid reacting substances (TBARS), carbonyl protein, nitric oxide content, superoxide dismutase and catalase activities and sulfhydryl protein content in the cerebellum of Wistar rats following pentylenetetrazole-induced seizures with or without organic or conventional grape juices.

Groups	TBARS (nmol MDA/mg of protein)	Carbonyl protein (nmol/mg of protein)	Nitric oxide content (mg/mL of sodium nitroprusside/mg protein)	Superoxide dismutase (U SOD/mg of protein)	Catalase (mmol H ₂ O ₂ /min/ mg of protein)	Sulfhydryl protein (nmol DTNB/mg of protein)
Control (saline)	0,30±0,02 ^a	2,23±0,30 ^a	1,64±0,27 ^a	8,02±0,51 ^{a,c}	6,20±0,99 ^{a,c}	0,32±0,03 ^a
PTZ (60 mg/kg)	0,96±0,05 ^b	3,32±0,24 ^b	6,33±0,88 ^b	5,37±0,72 ^b	3,51±0,27 ^b	0,12±0,01 ^b
Organic grape juice (10 µL/g)	0,17±0,02 ^c	1,32±0,16 ^c	1,53±0,03 ^a	11,99±1,95 ^d	10,30±0,86 ^c	0,55±0,04 ^c
Organic grape juice + PTZ	0,29±0,01 ^a	2,01±0,24 ^a	1,58±0,10 ^a	9,76±0,21 ^{c,d}	8,07±0,68 ^{c,d}	0,32±0,01 ^a
Conventional grape juice (10 µL/g)	0,23±0,04 ^{a,c}	1,06±0,14 ^c	1,72±0,14 ^a	11,00±0,03 ^d	9,61±0,56 ^{d,e}	0,35±0,03 ^a
Conventional grape juice + PTZ	0,22±0,01 ^{a,c}	1,11±0,24 ^c	1,77±0,15 ^a	6,36±0,04 ^{a,b}	4,10±0,39 ^{a,b}	0,30±0,02 ^a

Different letters indicate a statistically significant difference for each parameter evaluated.

Table 5: Determination of thiobarbituric acid reacting substances (TBARS), carbonyl protein, nitric oxide content, superoxide dismutase and catalase activities and sulfhydryl protein content in the cerebral cortex of Wistar rats following pentylenetetrazole-induced seizures with or without organic or conventional grape juices.

Groups	TBARS(nmol MDA/mg of protein)	Carbonyl protein(nmol/mg of protein)	Nitric oxide content (mg/mL of sodium nitroprusside/mg)	Superoxide dismutase (U SOD/mg of protein)	Catalase (mmol H₂O₂/min/ mg of protein)	Sulfhydryl protein (nmol DTNB/mg of protein)
Control (saline)	0,82±0,04 ^a	2,73±0,42 ^a	1,63±0,15 ^a	41,27±1,27 ^{a,c}	10,88±1,11 ^a	0,21±0,03 ^a
PTZ (60 mg/kg)	1,56±0,11 ^b	7,87±0,81 ^b	6,17±0,52 ^b	22,71±3,98 ^b	6,15±0,15 ^b	0,15±0,01 ^b
Organic grape juice (10 µL/g)	0,81±0,06 ^a	2,75±0,23 ^a	1,58±0,09 ^a	49,84±4,46 ^c	11,77±0,87 ^a	0,25±0,01 ^a
Organic grape juice + PTZ	1,06±0,12 ^a	2,00±0,30 ^a	1,44±0,14 ^a	48,65±7,88 ^c	11,49±0,53 ^a	0,24±0,01 ^a
Conventional grape juice (10 µL/g)	0,24±0,01 ^c	1,91±0,24 ^a	1,62±0,07 ^a	45,88±5,43 ^c	10,25±1,13 ^a	0,23±0,01 ^a
Conventional grape juice + PTZ	1,09±0,12 ^a	1,66±0,29 ^a	1,26±0,11 ^a	27,71±0,16 ^{a,b}	9,14±0,43 ^{a,b}	0,22±0,01 ^a

Different letters indicate a statistically significant difference for each parameter evaluated.

4. Discussion

In the central nervous system (CNS), the disruption of the naturally existing balance between the concentrations of inhibitory and excitatory neurotransmitters is thought to be the main cause of convulsive episodes. GABA deficiency (inhibitory neurotransmission) and the stimulation and modification of either the density or sensitivity of different glutamate receptor subtypes (excitatory neurotransmission) are associated with epilepsy. In contrast, the stimulation of GABA receptors or an increase in positive modulators produces anxiolysis, sedation, anesthesia, myorelaxation and anticonvulsant actions (Silva et al., 2009). The activation of excitatory amino-acid receptors by glutamate or N-methyl-D-aspartic acid has been known to accompany the generation of ROS and reactive nitrogen species, such as superoxide anion radicals, hydrogen peroxide, nitric oxide and peroxide anions, that lead to neuronal damage (Mori et al., 2004). Studies have shown that polyphenols, such as 6-methylflavanone (Hall et al., 2005), (-)-epigallocatechin gallate (Vignes et al., 2006), flavan-3-ol derivatives (Fernandez et al., 2008) and resveratrol (Li et al., 2010), are positive modulators of GABA receptors. Grape juices are rich in polyphenols, which have important antioxidant effects (Dani et al., 2007). In this study, we evaluated the neuroprotective and anticonvulsant effects of organic and conventional grape juices in an experimental model in which epilepsy was induced in Wistar rats by PTZ. Furthermore, we also evaluated possible behavioral changes and the phenolic profiles of rats treated with the juices.

Although both grape juices contain flavan-3-ol derivatives and resveratrol, neither were able to inhibit the seizures induced by PTZ (as measured by tonic-clonic seizure time, total seizure time, number of seizure and number of seizures reaching stage five on Racine's scale) (Figure 2). This result could be explained by the fact that the amounts of polyphenols present in grape juices are lower than those reported to be effective in binding to GABA receptors (Fernandez et al., 2008; Li et al., 2010).

PTZ may trigger a variety of biochemical processes, including the activation of membrane phospholipases, proteases and nucleases, causing the degradation of membrane phospholipid metabolism and proteolysis and protein phosphorylation; thus, PTZ could lead to a release of lipid peroxides and free radicals (Naziroglu et al., 2009; Obay et al., 2008; Silva et al., 2009). The present study shows that PTZ induces an increase in oxidative damage through lipid and protein oxidation in the hippocampus, cerebellum and cortical tissues assayed. The rats treated with organic and conventional grape juices showed an attenuation in the PTZ-induced increase in lipid and protein oxidation in all brain tissues (Tables 3, 4 and 5). Similar results were found with α -tocopheryl-L-ascorbate-2-O-phosphate diester (Yamamoto et al., 2002), lipoic acid (Militão et al., 2010), erdostein (Ilhan et al., 2005) and isopulegol (Silva et al., 2009) in different experimental models of induced epilepsy in rats.

The inactivation of ROS can be accomplished by antioxidant enzymes. The enzyme SOD plays a key role in detoxifying the superoxide anions from hydrogen peroxide and oxygen (Fridovich, 1998). The hydrogen peroxide that is formed may be decomposed by CAT in water and oxygen (Naziroglu et al., 2009). We observed that PTZ decreased SOD and CAT activity in the hippocampus (Table 3), cerebellum (Table 4) and cortex (Table 5). This effect may be due to a depletion of enzymes, as previously described by Obay et al. (2008) and Silva et al. (2009), in brain tissues treated with PTZ. Organic grape juice attenuates this decrease in the activities of SOD and CAT, as previously shown for erdosteine (Ilhan et al., 2005), ghrelin (Obay et al., 2008) and isopulegol (Silva et al., 2009) treatments in rats. In contrast, conventional juice was not able to block the modulation of enzymes induced by PTZ. While other studies are needed, it is possible that this effect could be due the reduced polyphenol (Table 2) and ascorbic acid (Table 1) content of the conventional grape juice. Organic juice also showed higher concentrations of catechin, cyanidin, epicatechin, malvidin diglycoside, procyanidin B1 and resveratrol compared to conventional juice (Table 2).

Phenolic compounds are secondary metabolites that are produced and accumulated in plant tissues. Organic farming is currently practiced worldwide and does not use pesticides or synthetic fertilizers. As pesticides are not used, plants are more susceptible to the actions of phytopathogens, and this susceptibility causes the plant to produce higher amounts of polyphenols as a means of defending itself (Dani et al., 2007; Soleas et al., 1997).

It has been demonstrated that seizures induced by PTZ produce changes in nitric oxide metabolism (Naziroglu et al., 2009). The generation of nitric oxide results in lipid peroxidation, which may also induce epileptic activity by the direct inactivation of glutamine synthase, thereby permitting an abnormal buildup of the major excitatory neurotransmitter glutamate (Dillioglugil et al., 2010; Militão et al., 2010, Tomé et al., 2010). In all tissues, both organic and conventional grape juices were able to attenuate the increase in nitric oxide content induced by PTZ. Similar results were observed for rats treated with lipoic acid (Militão et al., 2010) and α -tocopherol (Tomé et al., 2010) in a pilocarpine model of epilepsy.

Nitric oxide could react with superoxide, generating the potent tissue-damaging moiety peroxynitrite, which has a high affinity for sulfhydryl groups and thus inactivates several key sulfhydryl-bearing enzymes (Katzung, 2004). This effect is probably the reason that sulfhydryl proteins are reduced in the PTZ group. In contrast, in all tissues assayed, the treatment with either organic or conventional grape juice protected sulfhydryl groups from the oxidation induced by PTZ (Tables 3, 4 and 5).

We did not observe differences in the results obtained from the different tissues assayed. The hippocampus is part of the limbic system, and it is important for learning and memory (Hansen and Koeppen, 2002). In addition, the hippocampus is a structure that is involved in the expression and propagation of seizures (Bear and Lothman, 1993). The cortex represents the highest center for sensory and motor processing, and González-Ramírez et al. (2010) suggest that this tissue also participates in the expression and propagation of seizures.

The cerebellum coordinates smooth motor activities and processes muscle position (Hansen and Koeppen, 2002). More studies are needed to evaluate the association of these tissues with epileptic seizures.

The results of the present study demonstrate that both organic and conventional grape juices show important neuroprotective effects against PTZ-induced oxidative damage in rats. This effect could be important in reducing neuronal damage and, therefore, allow for a better quality of life for epileptic patients. Additionally, the open field test (Figure 1) shows that neither grape juice affects the behavior (locomotor and exploratory activities) of animals. Still, organic grape juice shows a tendency to decrease the anxiety of the rats. These findings indicate that grape juices will provide further insights into natural neuroprotective compounds and may lead to the development of therapeutic strategies for epileptic patients in pharmaceutical or nutraceutical areas.

Acknowledgments

The authors would like to thank the staff of the Laboratories of Oxidative Stress and Antioxidants, especially Aline Cerbaro, Bárbara Costa and Taís Pozzer, as well as José Inácio Gonzalez for their contributions to the treatment of the animals. We also thank Vinícola Perini and Cooperativa Aecia de Agricultores Ecologistas Ltda. for providing the grape juices. We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)-PRONEX/CNPq number 10/0044-3 for their financial support of this research study.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121-6.
- Aksenov, M. Y., Markesbery, W. R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 302, 141-145.
- Association of Official Analytical Chemists, 2005. *Official Methods of Analysis of AOAC International*, 18 th ed. Gaithersburg, MD.
- Bannister, J.V., Calabrese, L., 1987. Assays for Sod. *Methods Biochem. Anal.* 32, 279-312.
- Bear, J., Lothman, E.W., 1993. An *in vitro* study of focal epileptogenesis in combined hippocampal-para hippocampal slices. *Epilepsy Res.* 14, 183-93.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 7, 248-254.
- Costello, D.J. e Delanty, N., 2004. Oxidative injury in epilepsy: potential for antioxidant therapy? *Expert Rev. Neurother.* 4, 541-553.
- Dani, C., Oliboni, L.S., Vanderlinde, R., Bonatto, D., Salvador, M., Henriques, J.A., 2007. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally- produced grapes. *Food. Chem. Toxicol.* 45, 2574-2580.
- Dilliogluligil, M.O., Kir, H.M., Demir, C., Ilbay, G., Sahin, D., Dilliogluligil, O., Bambal, G., Mekik, H., Ates, N., 2010. Effect of pentylenetetrazole and sound stimulation induced single and repeated convulsive seizures on the MDA, GSH and NO levels, and SOD activities in rat liver and kidney tissues. *Brain Res. Bull.* 83, 356-359.
- Fernandez, S.P., Mewett, K.N., Hanrahan, J.R., Chebib, M., Johnston, G.A., 2008. Flavan-3-ol derivatives are positive modulators of GABAA receptors with higher efficacy for the $\alpha 2$ subtype and anxiolytic action in mice. *Neuropharmacology.* 55, 900-907.
- Fridovich, I., 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J. Exp. Biol.* 201, 1203-1209.

- Galani, V.J., Patel, B.G, 2010. Effect of hydroalcoholic extract of *Sphaeranthus indicus* against experimentally induced anxiety, depression and convulsions in rodents. *Int. J. Ayurveda Res.* 1(2), 87-92.
- González-Ramírez, M., Razo-Juárez, L.I., Sauer-Ramírez, J.L., González-Trujano, M.E., Salgado-Ceballos, H., Orozco-Suarez, S., 2010. Anticonvulsive effect of vitamin C on pentylenetetrazol-induced seizures in immature rats. *Pharmacol. Biochem. and Behav.* 97, 267–272.
- Green, L.C., Tannenbaum, S.R., Goldman, P., 1981. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science.* 212, 56–58.
- Hall, B. J., Chebib, M., Hanrahan, J.R., Johnston, G.A., 2005. 6-Methylflavanone, a more efficacious positive allosteric modulator of γ -aminobutyric acid (GABA) action at human recombinant $\alpha 2\beta 2\gamma 2_L$ than at $\alpha 1\beta 2\gamma 2_L$ and $\alpha 1\beta 2$ GABA_A receptors expressed in *Xenopus* oocytes. *Eur. J. Pharmacology.* 512, 97–104.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed. Oxford, New York.
- Hansen, J.T., Koeppen, B.M., 2002. *Atlas of neuroanatomy and neurophysiology. Selections from the Netter Collection of Medical Illustrations.* Special ed. Icon Custom Communications, U.S.A.
- Holzmann I., Cechinel Filho V., Mora T.C., Cáceres A., Martínez J.V., Cruz S.M., de Souza M.M, 2011. Evaluation of Behavioral and Pharmacological Effects of Hydroalcoholic Extract of *Valeriana prionophylla* Standl. From Guatemala. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2011, 1-9.
- Ilhan, A., Aladag, M.A., Kocer, A., Boluk, A., Gurel, A., Armutcu, F., 2005. Erdosteine ameliorates PTZ-induced oxidative stress in mice seizure model. *Brain Res. Bul.* 65, 495-499.

- Katzung, B.G., 2004. Basic and Clinical Pharmacology, Ninth ed. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York.
- Kwan, P., Brodie, M.J., 2000. Early identification of refractory epilepsy. *N. Engl. J. Med.* 342, 314-319.
- Lamuela-Raventós, R.M., Waterhouse, A.L., 1994. Direct HPLC separation of wine phenolics. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 1-5.
- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464-478.
- Li, C., Yan, Z., Yang, J., Chen, H., Li, H., Jiang, Y., Zhang, Z., 2010. Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by modulating the release of neurotransmitter and neuromodulator in rats. *Neurochem. Int.* 56, 495–500.
- Liu, R.H., 2003. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *Am. J. Clin. Nutr.* 78, 517S–20S.
- Maldonado, A., Ramos, W., Pérez, J., Huamán, L.A., Gutiérrez, E.L., 2010. Convulsive status epilepticus: clinico-epidemiologic characteristics and risk factors in Peru. *Neurologia.* 25, 478-484.
- McMurtrey, K.D., Minn, J., Pobanz, K., Schultz, T.P., 1994. Analysis of wines for resveratrol using direct injection high-pressure liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2077-2080.
- Militão, G.C., Ferreira, P.M., de Freitas, R.M., 2010. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. *Neurochem. Int.* 56, 16-20.
- Mori, A., Yokoi, I., Noda, Y., Willmore, L.J., 2004. Natural antioxidants may prevent posttraumatic epilepsy: a proposal based on experimental animal studies. *Acta Med. Okay.* 58, 111-8.

- Naziroglu, M., Kutluhan, S., Uğuz, A.C., Celik, O., Bal, R., Butterworth, P.J., 2009. Topiramate and Vitamin E Modulate the Electroencephalographic Records, Brain Microsomal and Blood Antioxidant Redox System in Pentylentetrazol-Induced Seizure of Rats. *J. Membrane Biol.* 229, 131–140.
- Obay, B.D., Taşdemir, E., Tümer, C., Bilgin, H.M., Atmaca, M., 2008. Dose dependent effects of ghrelin on pentylenetetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptides.* 29, 448–455.
- Office International de la Vigne et du Vin, 2003. HPLC- Determination of nine major anthocyanins in red and rosé wine. Resolution OENO 22/2003.
- Park, Y.K., Park, E., Kim, J.S., Kang, M.H., 2003. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutat. Res.* 529, 77–86.
- Racine, R., Okujava, V., Chipashvili, S., 1972. Modification of seizure activity by electrical stimulation. 3. Mechanisms. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32, 295-9.
- Reilly, C., Agnew, R., Neville, B.G.R, 2011. Depression and anxiety in childhood epilepsy: A review. *Seizure.* 20(8):589-597.
- Silva, M.I.G., Silva, M.A., de Aquino Neto, M.R., Moura, B.A., de Sousa, H.L., de Lavor, E.P., de Vasconcelos, P.F., Macêdo, D.S., de Sousa, D.P., Vasconcelos, S.M., de Sousa, F.C., 2009. Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. *Fitoterapia* 80, 506–513.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology, oxidant and antioxidants (Part A)*; Packer, L., Ed; Academic Press: San Diego, CA. 299, 159-178.

- Soleas, G.J., Diamandis, E.P., Goldberg, D.M., 1997. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* 30, 91–113.
- Sudha, K., Ashalatha, V. R, Anjali R., 2001. Oxidative Stress and antioxidants in epilepsy. *Clin. Chim. Acta*, 303, 19-24.
- Tomé, A.R., Feng, D., Freitas, R.M., 2010. The Effects of Alpha-Tocopherol on Hippocampal Oxidative Stress Prior to in Pilocarpine-Induced Seizures. *Neurochem. Res.* 35, 580–587.
- Vignes, M., Maurice, T., Lanté, F., Nedjar, M., Thethi, K., Guiramand, J., Récasens, M., 2006. Anxiolytic properties of green tea polyphenol (–)-epigallocatechin gallate (EGCG). *Brain research.* 1110, 102-115.
- Xu, K., Stringer, J.L., 2008. Antioxidants and free radical scavengers do not consistently delay seizure onset in animal models of acute seizures. *Epilepsy Behav.* 13, 77–82.
- Wahab, A., 2010. Difficulties in treatment and management of epilepsy and challenges in new drug development. *Pharmaceuticals.* 3, 2090–2110.
- World Health Organization (WHO), 2011. Health topics: Epilepsy. Find in: <<http://www.who.int/topics/epilepsy/en/>> Accessed: May, 2011.
- Wills, E.D., 1996. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem. J.* 99, 667-676.
- White, H.S., Smith, M.D., Wilcox, K.S., 2007. Mechanisms of action of antiepileptic drugs. *Int. Rev. Neurobiol.* 81, 85–110.
- Yamamoto, N., Kabuto, H., Matsumoto, S., Ogawa, N., Yokoi, I., 2002. α -Tocopheryl-L-ascorbate-2-O-phosphate diester, a hydroxyl radical scavenger, prevents the occurrence of epileptic foci in a rat model of post-traumatic epilepsy. *Pathophysiol.* 8, 205-214.

4.2 CAPÍTULO 2

ORGANIC AND CONVENTIONAL PURPLE GRAPE JUICES PREVENT PENTYLENETETRAZOL INDUCED OXIDATIVE DAMAGE IN THE LIVER AND SERUM OF WISTAR RATS

Adriana Dalpicolli Rodrigues¹, Thamiris Becker Scheffel¹, Gustavo Scola¹, Maitê Telles dos Santos², Bruna Fank², Caroline Dani², Regina Vanderlinde¹, João Antonio Pegas Henriques¹, Adriana Simon Coitinho³, Mirian Salvador^{1*}.

¹ Instituto de Biotecnologia, Universidade de Caxias do Sul (UCS), Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brazil.

² Centro Universitário Metodista do IPA, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

³ Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brazil.

*Corresponding author: Tel.: 55 54 3218 2105 Fax: 55 54 3218 2664. E-mail address: msalvado@ucs.br (M. Salvador)

ABSTRACT

Oxidative damages in hepatocytes may be caused by epilepsy and/or anticonvulsant drugs. Epilepsy is one of the most common neurological disorders, characterised by recurrent seizures, which may increase the content of reactive oxygen species in the body. Organic and

conventional grape juices are rich in polyphenols, compounds that show important antioxidant activity. The aim of this study was to investigate the possible protective effect of organic and conventional grape juices in limiting oxidative damage induced by pentylenetetrazole (PTZ, a standard convulsant drug) in the liver and serum of Wistar rats. Animals (n=16 in each group) received, by gavage, saline (control), organic grape juice or conventional grape juice (10 μ L/g of body weight) for 17 days. Subsequently, half of the rats in each group received PTZ (60 mg/kg). After 30 minutes, the animals were euthanized by decapitation. Liver and blood samples were isolated to evaluate oxidative characteristics (lipid and protein oxidation, nitric oxide metabolites (NOx) content, antioxidants defences and protein sulfhydryl content). The results of this study showed that although organic juice contains a higher polyphenol content than conventional juice, both juices conferred protection against lipid and protein oxidative damage and limited the increase in PTZ-induced NOx content in the liver and serum. Also, both juices inhibited the PTZ-induced reduction in enzymatic antioxidant defences (superoxide dismutase and catalase activities) and sulfhydryl protein content in the liver and serum. The findings suggest that the properties of grape juices may motivate the development of new therapeutic strategies for reducing oxidative damage in liver and serum of epileptic patients.

Keywords: epilepsy, oxidative damages, liver, serum, grape juices, polyphenols.

1. Introduction

Fulminant liver failure is a rare complication of grand mal seizures with a high mortality, the prognosis being largely determined by the combination of the hepatic and neurologic insults (Ichai *et al*, 2003). Epilepsy is a neurological disease that is characterised

by recurrent seizures and affects more than 50 million people worldwide (WHO, 2011). Recurrent and prolonged seizures can increase the content of reactive oxygen species (ROS) and lead to hepatic oxidative damage by lipid peroxidation in hepatocytes (Akbas *et al.*, 2005; Dillioglulugil *et al.*, 2010). The liver is among the tissues that act as organs of detoxification, protecting the body from dietary, environmental and metabolic chemicals and toxins (Dillioglulugil *et al.*, 2010). The mechanisms of acute liver failure resulting from epilepsy are poorly defined and appear to be multifactorial, including hypoxia and steatosis (Akbas *et al.*, 2005; Ichai *et al.*, 2003). These processes are associated with oxidative stress (Marcolin *et al.*, 2011; Rosa *et al.*, 2011), a condition characterised by an increase in the generation of free radicals and/or a decrease in the antioxidant defence systems (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Another concern associated with epilepsy is the side effects related to the drugs used for treating the disease. In general, anticonvulsant drugs are associated with a variety of side-effects, including chronic toxicity (Silva *et al.*, 2009), and can cause or exacerbate free radical-mediated damage (Aycicek *et al.*, 2007). Studies have shown that many anticonvulsant drugs, such as valproate, carbamazepine, phenytoin, lamotrigine and phenobarbital are metabolised in the liver and may elevate liver enzyme levels, which may result in hepatotoxic effects or another type of liver injury (Ichai *et al.*, 2003; Ochoa and Riche, 2009). Additionally, large doses or combinations of these drugs often deplete hepatic stores of enzymatic antioxidant defences and leave hepatocytes much more vulnerable to oxidative stress (Akbas, *et al.*, 2005).

Moreover, epileptic patients present an increase in lipid oxidative damage and a reduction in the activity of antioxidant enzymes in the serum or plasma, (Costello e Delanty, 2004) showing that this disease causes a systemic imbalance.

Grape juice is widely sold throughout the world and is an easily accessible food for consumption by the population (Bates *et al.*, 2011). Both organic (free of pesticides and

genetic engineering) and conventional (traditionally cultivated) juices may be found in the market. It has already been shown that organic grape juices present a higher polyphenol content than their conventional counterparts (Dani *et al.*, 2007). Polyphenols demonstrate important antioxidant activity, which may protect the body against oxidative damage generated by ROS (Ferguson, 2001).

In this context, the aim of the present study was to investigate the potential protective effects of organic and conventional purple grape juices in preventing oxidative damage induced by pentylenetetrazole (PTZ) [the most commonly used convulsant chemical agent (Silva *et al.*, 2009)] in the liver and serum of Wistar rats. Oxidative damage to lipids and proteins, nitric oxide metabolites (NOx) content, superoxide dismutase and catalase enzymatic activities and sulfhydryl protein content were evaluated.

2. Materials and Methods

2.1 Chemicals

2,4-dinitrophenylhydrazine, 5,5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid), thiobarbituric acid and pentylenetetrazole were obtained from Sigma-Aldrich. All other reagents (Merck and Hexapur) and solvents (Nuclear) were of analytical grade.

2.2 Grape juices

The purple grape juice samples used in this work were from *Vitis labrusca* grapes of the Bordeaux variety harvested in 2009. The organic juice was from Cooperativa Aecia Agricultores Ecologistas Ltda. (Antonio Prado, RS, Brazil) and it was certified by Rede de

Agroecologia ECOVIDA. The conventional juice was obtained from Vinícola Perini Ltda. (Farroupilha, RS, Brazil). The polyphenol profile of each grape juice is shown in Table 1.

Table 1

Total phenolic content (mg catechin/%) and major phenolic compounds (mg/L) of organic and conventional grape juices.

	Organic juice	Conventional juice
Total phenolic content	146.32±1.01	125.76±1.71*
Anthocyanins	340.76±0.47	255.03±0.35*
Catechins	33.68±0.01	14.06±0.01*
Gallic acid	5.30±0.01	8.27±0.01*
Procyanidins	14.47±0.31	15.21±0.27
Resveratrol	0.224±0.41	0.145±0.01*

* Statistically different from organic grape juice. Total phenolic content was measured using Folin-Ciocalteu colorimetric method (modification of Singleton *et al.*, 1999) and major compounds were measured by high-performance liquid chromatography (according methods described by OENO, 2003; Lamuela-Raventós and Waterhouse, 1994 and Mc Murtrey *et al.*, 1994).

2.3 Animals

Forty-eight male Wistar rats (3 months old, weighing 300±50 g) from the breeding colony of the Centro Universitário Metodista do IPA (Porto Alegre, Brazil) were used in the experiments. The number of animals was determined by the statistical F test MANOVA (F=3.21, $\alpha=0.05$, power=90%). The animals were handled under standard laboratory conditions consisting of a 12-hour light/dark cycle and maintained at a fixed temperature (25±2°C). Food and water were available *ad libitum*. All experimental procedures were performed in accordance with the Brazilian Society of Neurosciences and Behaviour. The

study was approved by the Research Ethics Committee of the Centro Universitário Metodista do IPA, number 298/2009.

2.4 Experimental design

The animals were randomly allocated to one of three experimental groups (n=16 per group): group 1 served as a control and received saline solution, groups 2 and 3 were given, by oral gavage, organic and conventional grape juices (10 μ L/g of body weight), respectively, once a day for 17 days (time determined by pilot testing). The doses of purple grape juice were determined by calculating the amount of juice consumed on average by a 70 kg human male, i.e., around 500 mL/day (Park *et al.*, 2003). Experiments were carried out between 8:00 a.m. and 13:00 p.m. in a noise-free room. On the eighteenth day, half of the rats in each group (n=8) received a single intraperitoneal (i.p.) dose of PTZ (60 mg/kg of body weight) that was dissolved in sterile isotonic saline. The other rats (negative control) received saline solution (i.p.). After 30 minutes, the animals were euthanized by decapitation and liver and blood samples were collected. The livers were washed with cold PBS buffer (isotonic solution) until to remove all blood. Serum samples were obtained by centrifugation of the blood (5 minutes at 3000 x g). The liver and serum samples were stored at -80°C until analysis. Before each assay, the livers were homogenised in phosphate buffered saline (pH 7.4) using a ground-glass-type Potter-Elvehjem homogeniser and centrifuged for 5 minutes. This supernatant was used in all assays. All processes were carried out under cold conditions (around 2-8°).

2.5 The protective effects of grape juice in the liver and serum

To examine the effects of grape juice, lipid and protein oxidative damage, NO_x content, and enzymatic (superoxide dismutase and catalase) and non-enzymatic (sulfhydryl protein) antioxidant defences were evaluated. The formation of thiobarbituric acid reactive species (TBARS) during an acid-heating reaction was used as an index of lipid peroxidation, as previously described by Wills (1996). The results were expressed as nmol of malondialdehyde (MDA)/mg of protein. The oxidative damage to the proteins was assessed by determining the number of carbonyl groups based on the reaction with dinitrophenylhydrazine (DNPH), as previously described by Levine *et al.* (1990). The results were expressed as nmol of DNPH/mg of protein. The NO_x production was determined based on the Griess reaction (modification of Green *et al.* 1981). Nitric oxide measurements are very difficult to assess in biological specimens, tissue nitrite (NO₂⁻) was estimated as an index of nitric oxide production (Ilhan *et al.*, 2005). The results were expressed as mg/mL of sodium nitroprusside/mg of protein. The superoxide dismutase (SOD) activity was assayed by measuring the inhibition of adrenaline auto-oxidation, as previously described (Bannister and Calabrese, 1987). The results were expressed as U SOD/mg of protein. One unit was defined as the amount of enzyme that inhibits the rate of adrenochrome formation by 50%. The catalase (CAT) activity was assayed by measuring the rate of decrease in hydrogen peroxide (H₂O₂) absorbance at 240 nm. The results were expressed as mmol H₂O₂/min/ mg of protein (Aebi, 1984). The protein sulfhydryl content were evaluated by the 5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) method and the results were expressed as nmol of DTNB/mg of protein (Aksenov and Markesbery, 2001). The protein concentration was measured by the Bradford method (1976), using bovine serum albumin as a standard.

2.6 Statistical analyses

All measurements were performed in triplicate. All values were presented as mean±standard error. The results were subjected to analysis of variance (ANOVA) and Tukey's post hoc test. SPSS 17.0 software package (SPSS Inc., Chicago, IL) was used in all statistical analysis.

3. Results

In this study, the effects of organic and conventional grape juice on the liver and serum of Wistar rats treated with PTZ were evaluated. It was observed that all PTZ-treated animals presented tonic-clonic seizures (data not shown). Grape juices alone do not cause seizure. In addition, PTZ treatments induced an increase in lipid peroxidation (TBARS), protein damage (carbonyl protein content) and NOx levels, in both the liver and serum of rats, when compared with the saline group. In addition, the SOD and CAT activities and the sulfhydryl protein content were reduced in the liver and serum of rats treated with PTZ (Tables 2 and 3). Conversely, organic and conventional grape juice treatments did not induce oxidative damage or an increase in NOx content, decrease in sulfhydryl protein content and the endogenous antioxidant defence levels in the liver (Table 2) and serum (Table 3) of rats were maintained. A pre-treatment with organic or conventional grape juice protected against PTZ-induced oxidative damage to lipids and proteins and the increased NOx content in the liver and serum of rats. Moreover, both grape juices prevented the decrease in the SOD and CAT activities and the reduction in the sulfhydryl protein content induced by PTZ in the liver and serum of rats (Tables 2 and 3).

Table 2

Determination of thiobarbituric acid reacting substances (TBARS), carbonyl protein, NOx content, superoxide dismutase, catalase and sulfhydryl protein in the liver of rats treated with organic or conventional grape juices in PTZ-induced seizures

Groups	TBARS (nmol of MDA/mg of protein)	Carbonyl protein (nmol of DNPH/mg of protein)	NOx content (mg/mL of sodium nitroprusside/mg of protein)	Superoxide dismutase (U SOD/mg of protein)	Catalase (mmol H₂O₂/min/mg of protein)	Sulfhydryl protein (nmol DTNB/mg of protein)
Control (saline)	0.44±0.06 ^a	1.37±0.09 ^a	1.26±0.07 ^{a,c}	2.48±0.26 ^a	73.15±8.33 ^a	0.33±0.01 ^{a,c}
PTZ (60 mg/kg)	0.62±0.03 ^b	2.53±0.08 ^b	3.37±0.09 ^b	1.07±0.15 ^b	42.88±1.22 ^b	0.17±0.01 ^b
Organic grape juice (10 µL/g)	0.29±0.02 ^c	1.30±0.16 ^a	1.22±0.11 ^a	2.05±0.45 ^a	85.24±6.79 ^a	0.39±0.04 ^a
Organic grape juice+PTZ	0.32±0.03 ^c	1.06±0.21 ^a	1.53±0.03 ^c	2.21±0.49 ^a	82.22±8.43 ^a	0.30±0.01 ^c
Conventional grape juice (10 µL/g)	0.28±0.02 ^c	1.21±0.23 ^a	1.23±0.05 ^a	1.90±0.01 ^a	68.89±2.46 ^a	0.24±0.01 ^d
Conventional grape juice+PTZ	0.24±0.01 ^c	1.40±0.19 ^a	1.51±0.10 ^c	2.02±0.17 ^a	77.55±1.38 ^a	0.29±0.01 ^{c,d}

Different letters indicate a significant difference among the groups according to the analysis of variance and Tukey's post hoc test ($p < 0.05$) for each parameter evaluated.

Table 3

Determination of thiobarbituric acid reacting substances (TBARS), carbonyl protein, NOx content, superoxide dismutase, catalase and sulfhydryl protein) in the serum of rats treated with organic and conventional grape juices in PTZ-induced seizures

Groups	TBARS (nmol of MDA/mg of protein)	Carbonyl protein (nmol of DNPH/mg of protein)	NOx content (mg/mL of sodium nitroprusside/mg of protein)	Superoxide dismutase (U SOD/mg of protein)	Catalase (mmol H₂O₂/min/mg of protein)	Sulfhydryl protein (nmol DTNB/mg of protein)
Control (saline)	0.22±0.02 ^{a,c}	1.11±0.11 ^a	0.35±0.04 ^a	0.64±0.16 ^a	11.56±1.09 ^a	0.11±0.01 ^a
PTZ (60 mg/kg)	0.28±0.01 ^b	1.77±0.05 ^b	0.51±0.02 ^b	0.17±0.01 ^b	6.69±0.39 ^b	0.07±0.01 ^b
Organic grape juice (10 µL/g)	0.20±0.01 ^a	0.72±0.04 ^c	0.25±0.07 ^a	0.66±0.01 ^a	11.41±1.37 ^a	0.11±0.01 ^a
Organic grape juice+PTZ	0.22±0.01 ^{a,c}	0.74±0.05 ^c	0.35±0.01 ^a	0.50±0.01 ^a	10.87±0.90 ^a	0.12±0.01 ^a
Conventional grape juice (10 µL/g)	0.19±0.01 ^a	0.84±0.08 ^c	0.31±0.01 ^a	0.66±0.01 ^a	10.94±1.36 ^a	0.12±0.01 ^a
Conventional grape juice+PTZ	0.23±0.01 ^c	1.03±0.03 ^a	0.27±0.01 ^a	0.58±0.01 ^a	10.65±1.20 ^a	0.10±0.01 ^a

Different letters indicate a significant difference among the groups according to the analysis of variance and Tukey's post hoc test (p<0.05) for each parameter evaluated.

4. Discussion

Recurrent and prolonged seizures and anticonvulsant drugs may increase the concentration of ROS in the body, which may result in substantial deleterious effects on an individual's health. The liver, in particular, is an organ that is sensitive to oxidative damage (Dillioglugil *et al.*, 2010). Seizures may lead to lipid peroxidation and decreased antioxidant defence mechanisms in hepatocytes (Akbas *et al.*, 2005; Dillioglugil *et al.*, 2010). These types of damage may lead to epilepsy complications, such as fulminant liver failure (Akbas *et al.*, 2005). Furthermore, anticonvulsant drugs may elevate liver enzyme levels, to deplete hepatic enzymatic antioxidant defences, which may result in hepatotoxic effects or liver injury (Ichai *et al.*, 2003; Akbas, *et al.*, 2005; Ochoa and Riche, 2009). Epileptic patients also present alterations in the redox status of their serum samples (Costello e Delanty, 2004). Grape juices are rich in polyphenols (Dani *et. al.*, 2007), compounds with important antioxidant activity (Ferguson, 2001). In this study, the possible protective effects of organic and conventional grape juice on the liver and serum of Wistar rats treated with PTZ were evaluated. The dose of PTZ used (60 mg/kg of body weight) is between half of the effective dose to cause seizures (33 mg/kg) and the median lethal dose (75 mg/kg) (Ilhan *et al.*, 2005).

The results show that seizures induced by PTZ lead to an increase in lipid and protein damage and NO_x content, and to a decrease in SOD and CAT activities and sulfhydryl protein content in the liver (Table 2) and serum (Table 3) of rats. These results are consistent with previous data of rats treated with PTZ (Akbas *et al.*, 2005; Armagan *et al.*, 2008; Dillioglugil *et al.*, 2010 and Obay *et al.*, 2008). Several studies have shown that PTZ may trigger a variety of biochemical processes, including proteolysis and the release of ROS (Naziroglu *et al.*, 2009; Obay *et al.*, 2008; Silva *et al.*, 2009), such as superoxide and NO_x (Naziroglu *et al.*, 2009), which can lead to lipid and protein damage and a decrease in antioxidant defences and

sulfhydryl protein content (Dilliogluligil *et al.*, 2010; Militão *et al.*, 2010, Tomé *et al.*, 2010). Moreover, the increased oxidative stress observed in the liver of rats could be due to the activation of glutamate receptors in the liver. The activation of type-5 metabotropic glutamate (mGLU5) receptors contributes to the development of hypoxia-induced liver cell injury (Storto *et al.*, 2004).

Superoxide dismutase and CAT are the main enzymes in the enzymatic antioxidant defence system, which is responsible for protecting against the increase in ROS production (Naziroglu *et al.*, 2009). The superoxide dismutase enzyme plays a key role in detoxifying superoxide anions in hydrogen peroxide and oxygen (Fridovich, 1998), and CAT may decompose hydrogen peroxide in water and oxygen (Naziroglu *et al.*, 2009). A poor defence system allows for the formation of superoxide anions and hydrogen peroxide. The superoxide radical can react with NO_x, generating a highly reactive molecule, the peroxynitrite anion, which is able to induce lipid oxidation and inactivate several key sulfhydryl-bearing enzymes (Katzung, 2005), depleting the sulfhydryl protein content.

Treatment with organic or conventional grape juice (without PTZ treatment) was unable to induce oxidative stress in the liver and serum of rats (Table 2 and 3), which is in agreement with data obtained by Dani *et al.* (2008) in Wistar rats. Furthermore, pre-treatments with organic or conventional grape juice completely protected against PTZ-mediated lipid and protein damage, the increase in NO_x content and the decrease in the antioxidants defenses and sulfhydryl protein content in liver (Table 2) and serum of rats (Table 3). The hormone ghrelin (Obay *et al.*, 2008) treatment was also able to reduce lipid damages and increasing antioxidant enzymes activities in the liver of a PTZ epilepsy model in rats. However, ghrelin potently stimulates hunger and growth hormone secretion (Obay *et al.*, 2008) and this may not be favourable for all patients. Similar results (reduce of the NO_x content and increase antioxidant enzymes activities induced by PTZ in rats) were observed for

topiramate plus vitamin E treatment (Naziroglu *et al.*, 2009). Grape juices dose were calculated by the daily amount of juice consumed on average by a 70 kg human male and they present the same or better results than observed for ghrelin (Obay *et al.*, 2008) and topiramate plus vitamin E (Naziroglu *et al.*, 2009).

It is possible that these effects are due to the high levels of polyphenols present in both juices. Phenolic compounds are secondary metabolites, which possess important antioxidant properties and are produced and accumulate in plant tissues. In this study, organic and conventional grape juices were studied. Organic farming does not use pesticides and synthetic fertilizers. Because pesticides are not used, plants are more susceptible to the action of phytopathogens, and this induces the organic plant to produce higher amounts of polyphenols as a means to defend itself (Dani *et al.*, 2007; Soleas *et al.*, 1997). In fact, the organic juice assayed in our work showed a higher content of total polyphenols, anthocyanins, catechins, and resveratrol than the conventional juice (Table 1). However, both juices presented the same protective effect against oxidative damages induced by PTZ in both the liver and serum of rats. Manach *et al.* (2005) showed that the absorption (mg/kg) of polyphenols, such as anthocyanins, catechins and procyanidins, by the body is approximately at the scale of nano or micromoles per litre. Nevertheless, even at this low concentration, it was possible to observe antioxidant, cardioprotective, anticancer, anti-inflammatory and antimicrobial properties (Xia *et al.*, 2010). Besides, it was already shown that different concentrations of wine wastes (Scola *et al.*, 2010), the hormone ghrelin (Obay *et al.*, 2008), and the monoterpene isopulegol (Silva *et al.*, 2009) present the same biological results in rats tissues. The mechanisms of the antioxidant action of these compounds may include suppressing ROS formation by inhibiting enzyme depletion or by chelating trace elements involved in free radical production, scavenging ROS and up-regulating or protecting the antioxidant defences (Halliwell & Gutteridge, 2007).

In conclusion, these data demonstrate that both organic and conventional grape juices present important hepatic and systemic protection effects against oxidative damages induced by PTZ in Wistar rats. These effects could be important in reducing hepatocyte damage in epileptic patients. Moreover, although additional studies are needed, serum samples could be used for monitoring the oxidative damage in these individuals.

Acknowledgments

The authors would like to thank the staff of the Laboratory of Oxidative Stress and Antioxidants. Specifically, the authors would like to acknowledge Aline Cerbaro and Taís Pozzer for their contributions to the realisation of the tests and Suzana Cesa Vieira de Freitas and José Inácio Gonzalez Solari for their contributions to the treatment of animals. We also thank Vinícola Perini and Cooperativa Aecia de Agricultores Ecologistas Ltda. for supplying the grape juices. We thank Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul (FAPERGS)-PRONEX/CNPq number 10/0044-3 for financial support during this research study.

References

- Aebi, H., 1984. Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol.* 105, 121-6.
- Akbas, S. H., Yegin, A., Ozben, T., 2005. Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. *Clin biochem.* 38, 1009-1014.

- Aksenov, M. Y., Markesbery, W. R., 2001. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. *Neurosci Lett.* 302, 141-145.
- Armagan, A., Kutluhan, S., Yilmaz, M., Yilmaz, N., Bulbul, M., Vural, H., Soyupek, S., Nazuroglu, M., 2008. Topiramate and vitamin e modulate antioxidant enzyme activities, nitric oxide and lipid peroxidation levels in pentylenetetrazol-induced nephrotoxicity in rats. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 103, 166-170.
- Aycicek, A. and Iscan, A., 2007. The effects of carbamazepine, valproic acid and phenobarbital on the oxidative and antioxidative balance in epileptic children. *Eur Neurol.* 57, 65-69.
- Bannister, J. V. and Calabrese, L., 1987. Assays for SOD. *Methods Biochem Anal.* 32, 279-312.
- Bates, R.P., Morris, J. R., Crandall, P. G., 2011. Principles and practices of small - and medium - scale fruit juice processing. *FAO agricultural services bulletin* 146. Find in: <<http://www.fao.org>>. Accessed: May, 2011.
- Bradford, M. M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem.* 7, 248-254.
- Costello, D. J. and Delanty N., 2004. Oxidative injury in epilepsy: potential for antioxidant therapy? *Expert Rev Neurother.* 4(3), 541-553.
- Dani, C., Oliboni, L. S., Vanderlinde, R., Bonato, D., Salvador, M., Henriques, J.A, 2007. Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally- produced grapes. *Food Chem Toxicol.* 45, 2574-2580.

- Dani, C., Oliboni, L. S., Pasquali, M. A., Oliveira, M. R., Umezu, F. M., Salvador, M., Henriques, J. A., 2008. Intake of purple grape juice as a hepatoprotective agent in Wistar rats. *J Med Food*. 11(1), 127-132.
- Dillioglulugil, M.O., Kir, H.M., Demir, C., Ilbay, G., Sahin, D., Dillioglulugil, O., Bambal, G., Mekik, H., Ates, N., 2010. Effect of pentylenetetrazole and sound stimulation induced single and repeated convulsive seizures on the MDA, GSH and NO levels, and SOD activities in rat liver and kidney tissues. *Brain Res. Bull.* 83, 356–359.
- Ferguson, L. R., 2001. Role of plant polyphenols in genomic stability. *Mutat Res.* 475, 89-111.
- Fridovich, I., 1998. Oxygen toxicity: a radical explanation. *J Exp Biol*; 201(8), 1203-1209.
- Green, L. C., Tannenbaum, S. R. , Goldman, P., 1981. Nitrate synthesis in the germfree and conventional rat. *Science*. 212, 56-58.
- Halliwell, B. and Gutteridge, J. M. C., 2007. *Free Radicals in Biology and Medicine*, third ed. New York: Oxford.
- Ichai, P., Huguet, E., Guettier, C., Azoulay, D., Gonzalez, M. E., Fromenty B, Masnou, P., Saliba., F., Roche, B., Zeitoun, F., Castaing, D. Samuel, D., 2003. Fulminant hepatitis after grand mal seizures: mechanisms and role of liver transplantation. *Hepatology*. 38(2), 443-451.
- Ilhan, A., Aladag, M.A., Kocer, A., Boluk, A., Gurel, A., Armutcu, F., 2005. Erdosteine ameliorates PTZ-induced oxidative stress in mice seizure model. *Brain Res. Bul.* 65, 495-499.
- Katzung, B.G., 2004. *Basic and Clinical Pharmacology*, Ninth ed. Lange Medical Books/McGraw-Hill, New York.
- Lamuella-Raventós, R.M., Waterhouse, A.L., 1994. Direct HPLC separation of wine phenolics. *Am. J. Enol. Vitic.* 45, 1-5.

- Levine, R.L., Garland, D., Oliver, C.N., Amici, A., Climent, I., Lenz, A.G., Ahn, B.W., Shaltiel, S., Stadtman, E.R., 1990. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol.* 186, 464-478.
- Manach, C., Williamson, G., Morand, C., Scalbert, A., Rémésy, C., 2005. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr*; 81(suppl), 230S-242S.
- Marcolin, E., Forgiarini, L. F., Tieppo, J., Dias, A. S., De Freitas, L. A. R., Marroni, N. P., 2011. Methionine- and choline-deficient diet induces hepatic changes characteristic of non-alcoholic steatohepatitis. *Arq Gastroenterol.* 48(1), 72-79.
- McMurtrey, K.D., Minn, J., Pobanz, K., Schultz, T.P., 1994. Analysis of wines for resveratrol using direct injection high-pressure liquid chromatography with electrochemical detection. *J. Agric. Food Chem.* 42, 2077-2080.
- Militão, G.C., Ferreira, P.M., de Freitas, R.M., 2010. Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. *Neurochem. Int.* 56, 16-20.
- Naziroglu, M., Kutluhan, S., Uğuz, A.C., Celik, O., Bal, R., Butterworth, P.J., 2009. Topiramate and Vitamin E Modulate the Electroencephalographic Records, Brain Microsomal and Blood Antioxidant Redox System in Pentylentetrazol-Induced Seizure of Rats. *J. Membrane Biol.* 229, 131–140.
- Obay, B.D., Taşdemir, E., Tümer, C., Bilgin, H.M., Atmaca, M., 2008. Dose dependent effects of ghrelin on pentylentetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. *Peptides.* 29, 448–455.
- Ochoa, J. G. and Riche, W. Antiepileptic Drugs. Find in: <<http://emedicine.medscape.com/article/1187334-print>>. Accessed: Julho, 2011.
- Office International de la Vigne et du Vin, 2003. HPLC- Determination of nine major anthocyanins in red and rosé wine. Resolution OENO 22/2003.

- Park, Y.K., Park, E., Kim, J.S., Kang, M.H., 2003. Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutat. Res.* 529, 77–86.
- Rosa, D. P., Martinez, D., Picada, J. N., Semedo, J. G. Marroni, N. P, 2011. Hepatic oxidative stress in an animal model of sleep apnoea: effects of different duration of exposure. *Comp Hepatol.* 10(1), 2-7.
- Scola, G., Conte, D., Spada, P. W. D. S., Dani, C., Vanderlinde, R., Funchal, C., Salvador, M., 2010. Flavan-3-ol compounds from wine wastes with in vitro and in vivo antioxidant activity. *Nutrients.* 2, 1048-1059.
- Silva, M.I.G., Silva, M.A., de Aquino Neto, M.R., Moura, B.A., de Sousa, H.L., de Lavor, E.P., de Vasconcelos, P.F., Macêdo, D.S., de Sousa, D.P., Vasconcelos, S.M., de Sousa, F.C., 2009. Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. *Fitoterapia* 80, 506–513.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela-Raventós, R.M., 1999. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In *Methods in enzymology, oxidant and antioxidants (Part A)*; Packer, L., Ed; Academic Press: San Diego, CA. 299, 159-178.
- Soleas, G.J., Diamandis, E.P., Goldberg, D.M., 1997. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin. Biochem.* 30, 91–113.
- Storto, M., Battaglia, G., Gradini, R., Bruno, V., Nicoletti, F., Vairetti, M., 2004. Mouse hepatocytes lacking mGlu5 metabotropic glutamate receptors are less sensitive to hypoxic damage. *Eur J Pharmacol.* 497(1), 25-7.
- Tomé, A.R., Feng, D., Freitas, R.M., 2010. The Effects of Alpha-Tocopherol on Hippocampal Oxidative Stress Prior to in Pilocarpine-Induced Seizures. *Neurochem. Res.* 35, 580–587.

Wills, E.D., 1996. Mechanism of lipid peroxide formation in animal tissues. *Biochem. J.* 99, 667-676.

World Health Organization (WHO), 2011. Health topics: Epilepsy. Find in: <http://www.who.int/topics/epilepsy/en/> Accessed: May, 2011.

Xia, E. Q., Deng, G. F., Guo, Y. J., Li, H. B., 2010. Biological Activities of Polyphenols from Grapes. *Int J Mol Sci.* 11, 622-646.

5. DISCUSSÃO GERAL

A epilepsia é um dos distúrbios neurológicos crônicos mais comuns e antigos do mundo (WHO, 2011). A doença é caracterizada pela presença de duas ou mais crises convulsivas espontâneas e recorrentes (Harrison & Fauci *et al.*, 2008). No Brasil, estima-se que cerca de 3 milhões de pessoas são portadoras de epilepsia (BRASIL, 2010). Existem três tipos de crises: as parciais ou focais, as generalizadas e as crises não classificáveis. Nas crises parciais ou focais ocorre ativação de uma parte do cérebro, com ou sem comprometimento da consciência. As crises generalizadas são aquelas em que há envolvimento de amplas áreas de ambos os hemisférios cerebrais. Essas crises podem ocorrer com graus diferentes de aumento das contrações musculares, ou seja: do tipo tônica (contrações com duração de poucos segundos a minutos), clônica (contrações seguidas de relaxamento e com abalos musculares sucessivos) e mioclônica (contrações muito breves, semelhantes a choques). São consideradas não classificáveis, as crises que não se enquadram em nenhum dos dois subtipos (Berg *et al.*, 2010).

A recorrência das crises epiléticas predispõe ao aumento das espécies reativas no organismo e, conseqüentemente, de danos oxidativos em diferentes tecidos (Sudha *et al.*, 2001; Obay *et al.*, 2008; Dillioglugil *et al.*, 2010). Esses danos também poderiam estar associados à ocorrência de outras doenças como as neurodegenerativas, a cirrose, o câncer e a aterosclerose, entre outras (Halliwell & Gutteridge, 2007). Já é sabido que a epilepsia aumenta o risco de morte prematura em, aproximadamente, 2 a 3 vezes quando compara-se com a população que não sofre dessa doença (Maldonado *et al.*, 2010; WHO, 2011).

Embora exista um grande número de drogas anticonvulsivantes para o tratamento da epilepsia, apenas 50% dos pacientes tem suas crises totalmente controladas com a medicação (LBE, 2012; Kwan & Brodie, 2000). Mesmo assim, os pacientes tratados apresentam um

maior risco para a ocorrência de efeitos colaterais, como alterações ósseas, fraturas (Pack, 2008), danos hepáticos (Ichai *et al.*, 2003) e toxicidade crônica (Silva *et al.*, 2009), entre outros. Além disso, alguns medicamentos utilizados no tratamento da epilepsia podem aumentar a produção de MDA e de espécies reativas no organismo (Aycicek & Iscan, 2007).

Em busca de alternativas para o tratamento da epilepsia, observou-se que compostos fenólicos como a rutina (Nassiri-Asl *et al.*, 2008) e o resveratrol (Wu *et al.*, 2009) apresentaram atividade anticonvulsivante em ratos. O tratamento com rutina aumentou em 364% o tempo de latência para o início das convulsões e diminuiu em 20% a mortalidade dos animais. O resveratrol, por sua vez, diminuiu em 86% o número das convulsões e reduziu, significativamente, a perda neuronal. Considerando-se que sucos de uva apresentam um conteúdo significativo de compostos fenólicos e vitamina C (Dani *et al.*, 2007), este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante e anticonvulsivante de sucos de uva Bordô, orgânico e convencional, e seu efeito no comportamento de ratos Wistar.

Um dos instrumentos bastante utilizados para avaliação da intensidade das convulsões em modelos experimentais de epilepsia é a escala de Racine (Racine *et al.*, 1972). Para tanto, avalia-se o comportamento dos animais durante as crises, o que permite classificar as convulsões em cinco estágios de intensidade: nível 1 (presença de movimentos da boca e da face), nível 2 (presença de movimentos do tipo balançar da cabeça); nível 3 (os animais apresentam movimentos clônicos do tórax); nível 4 (convulsões caracterizadas por levantamento vertical do corpo do animal); e nível 5 (convulsões caracterizadas por levantamento vertical e queda do corpo do animal) (Racine *et al.*, 1972).

Observou-se, no presente estudo, que os sucos de uva Bordô, tanto orgânico quanto convencional, não foram capazes de reduzir a latência, o tempo de convulsão tônico-clônica, o tempo de convulsão total, o número de convulsões e o número de animais que atingiram o nível cinco da escala de Racine (Figura 2; capítulo 1). Resultados similares já foram

observados com extrato etanólico de *Symphopappus casarettoi* (Florian *et al.*, 2009), o qual possui compostos fenólicos em sua composição (Benetti *et al.*, 2007). Em contrapartida, o tratamento de ratos Wistar com 20, 50 e 150 nM do flavonóide rutina (Nassiri-Asl *et al.*, 2008) e com 15 mg/Kg de resveratrol (Wu *et al.*, 2009) foi capaz de diminuir neles os efeitos convulsivos, o que foi atribuído à modulação positiva de receptores GABAérgicos (Nassiri-Asl *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2010). Embora os sucos de uva estudados nesse trabalho tenham apresentado teores significativos de compostos fenólicos totais (146.32±1.01 mg% de catequina para o suco orgânico e 125.76±1,71 mg% de catequina para o convencional), nenhum dos sucos apresentou rutina e a concentração de resvetratrol em cada administração de suco de uva (2,23 ng/Kg para o orgânico e 1,45 ng/Kg para o convencional) foi inferior a que apresentou atividade anticonvulsivante em ratos Wistar (Wu *et al.*, 2009), o que pode explicar, ao menos em parte, os resultados obtidos nesse trabalho. Apesar disso, observou-se, embora sem significância estatística, que o tratamento dos ratos com o suco orgânico (maior teor de compostos fenólicos) foi capaz de reduzir o tempo de convulsões tônico-clônicas, de convulsões totais e diminuir o número de episódios convulsivos nos animais (Figura 2; capítulo 1). Outros estudos com concentrações mais elevadas dos compostos fenólicos presentes no suco poderiam contribuir para elucidar esses resultados.

Para a indução das convulsões nesse trabalho, utilizou-se 60 mg/kg de PTZ, administrado intraperitonealmente, em dose única. Essa concentração foi escolhida, pois está entre a menor dose média eficaz para causar convulsões (33 mg/kg) e a dose média letal (75 mg/kg) (Ilhan *et al.*, 2005). Observou-se que o tratamento com PTZ induziu uma mortalidade de 50%, a qual foi reduzida para 33% pelo tratamento com o suco orgânico. Curiosamente, o tratamento com o suco convencional evitou completamente a mortalidade induzida pelo PTZ (Anexo II). Até o momento, os mecanismos responsáveis pela mortalidade induzida por PTZ

não estão esclarecidos e estudos adicionais seriam importantes para a compreensão desse efeito.

As convulsões recorrentes, características da epilepsia, podem levar a danos e perdas neuronais devido, principalmente, à alta produção de espécies reativas durante as crises (Wu *et al.*, 2009; Dilliogluligil *et al.*, 2010), o que predispõe os pacientes a uma maior incidência de doenças associadas ao estresse oxidativo. Nesse trabalho, observou-se que os tratamentos com os sucos de uva Bordô, tanto orgânico quanto convencional, foram capazes de reduzir, significativamente, os danos oxidativos induzidos por PTZ em sistema nervoso central (hipocampo, cerebelo e córtex cerebral), fígado e soro de ratos Wistar (Tabelas 3, 4 e 5; capítulo 1 e Tabelas 2 e 3; capítulo 2). Além disso, ambos os sucos evitaram a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT e do conteúdo de proteínas sulfidril induzida por PTZ, no fígado e no soro dos ratos tratados (Tabelas 2 e 3; capítulo 2). Entretanto, no SNC, somente o tratamento com suco orgânico foi capaz de evitar a diminuição da atividade de SOD e CAT. O pré-tratamento com ambos os sucos também reduziu a oxidação de proteínas sulfidril induzida por PTZ no SNC (Tabelas 3, 4 e 5; capítulo 1).

Embora o conteúdo de compostos fenólicos totais do suco orgânico tenha sido 17% maior do que o observado para o suco convencional (Tabela 2; capítulo 1), o efeito sobre os parâmetros oxidativos analisados (exceto SOD e CAT, no SNC) mostrou-se o mesmo. É possível que concentrações mais baixas de compostos fenólicos, como as observadas no suco convencional, sejam suficientes para a obtenção de efeitos biológicos significativos. Resultados similares foram observados em estudos com resíduos de vinificação (Scola *et al.*, 2010), com o hormônio grelina (Obay *et al.*, 2008) e o monoterpeno isopulegol (Silva *et al.*, 2009), em diferentes tecidos de ratos. De fato, já foi relatado (Xia *et al.*, 2010) que as antocianinas, catequinas e procianidinas apresentam atividades biológicas (antioxidante, cardioprotetora, anticancerígena, anti-inflamatória e antimicrobiana) na faixa de concentração

de nano ou micromoles por litro. Os mecanismos de ação desses compostos incluem a supressão da formação de espécies reativas por inibição da depleção enzimática, quelação de metais, varredura de espécies reativas, além da regulação e/ou proteção das defesas enzimáticas (Halliwell & Gutteridge, 2007).

Ao contrário do suco orgânico, o suco convencional não foi capaz de evitar a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT induzida por PTZ. É importante salientar que o suco orgânico apresentou quantidades significativamente maiores de catequina, epicatequina e vitamina C (Tabelas 1 e 2; capítulo 1), compostos reconhecidamente capazes de varrer as espécies reativas $O_2^{\bullet-}$ e H_2O_2 (Halliwell & Gutteridge, 2007). Além disso, considerando-se que a administração dos sucos aos animais foi feita por gavagem, é possível que uma concentração menor de compostos fenólicos tenha atravessado a barreira hemato-encefálica, o que poderia explicar os resultados contraditórios (atividade de SOD e CAT) obtidos no SNC, fígado e soro.

Em resumo, esse trabalho mostrou que tanto o suco orgânico como o convencional são capazes de evitar/minimizar danos oxidativos induzidos por PTZ no SNC, fígado e soro dos animais tratados. A diminuição dos danos neurais pode contribuir para a redução de doenças como Parkinson, Alzheimer, etc., reconhecidamente associadas ao estresse oxidativo. A atividade antioxidante hepática tem importância na redução de complicações como a insuficiência hepática fulminante, que mesmo sendo rara, apresenta um índice alto de mortalidade em paciente epiléticos (Ichai *et al.*, 2003). Os sucos de uva foram capazes, também, de reduzir danos oxidativos séricos, mantendo o metabolismo redox equilibrado mesmo durante as crises convulsivas.

Além do suco de uva, outros compostos também mostraram atividade antioxidante e anticonvulsivante em diferentes modelos de epilepsia, como revisado na Tabela 1. No entanto, as concentrações de ácido lipóico (20 mg/Kg), α -tocoferol (200 mg/Kg) e vitamina C

(250 mg/Kg) empregadas nos estudos foram bastante altas. Se fosse possível extrapolar para humanos, essas doses seriam equivalentes a 1,4g de ácido lipóico, 14,0g de α -tocoferol e 17,5g de vitamina C para um homem de 70Kg. De acordo com Otten *et al.* (2006), essas concentrações excedem o consumo diário máximo recomendado (1mg, 1g e 2g, para cada composto, respectivamente). Embora não existam recomendações de ingesta diária para a curcumina, isopulegol e resveratrol, esses compostos também foram utilizados em doses elevadas. Outros estudos sobre a possibilidade de efeitos adversos para estes tratamentos ainda precisariam ser realizados. Mesmo que a grelina (Obay *et al.*, 2008) tenha sido o único composto ensaiado em doses baixas (da ordem de microgramas), esse hormônio pode estimular potencialmente a fome e a secreção do hormônio do crescimento, limitando sua utilização em pacientes epiléticos.

Além do efeito antioxidante observado, os sucos de uva Bordô utilizados nesse estudo não alteraram a capacidade locomotora, exploratória e a ansiedade (teste de *open field*), sendo que o tratamento com o suco orgânico mostrou, ainda, uma tendência a reduzir a ansiedade dos animais tratados (Figura 1; capítulo 1). A dose de suco de uva administrada aos animais foi equivalente ao consumo de 500 mL/dia de suco, para um homem de 70kg (Park *et al.*, 2003), o que permite sugerir que o consumo diário de suco de uva possa contribuir com a diminuição dos danos oxidativos em pacientes epiléticos. Deve ser ressaltado, no entanto, que o suco de uva é um produto com quantidades consideráveis de glicose e frutose, o que pode limitar a sua utilização por pacientes pré- diabéticos ou diabéticos. Neste sentido, é possível estudar a formulação de suplementos alimentares específicos, o que, além de melhorar a qualidade de vida de indivíduos portadores de epilepsia, contribuiria para o aumento do valor agregado do suco de uva, favorecendo a vitivinicultura nacional.

Tabela 1. Atividades antioxidante e anticonvulsivante apresentadas por diferentes compostos em modelos animais de epilepsia.

Composto ensaiado	Modelo de estudo	Dose/via do composto testado	Tipo de tratamento	Droga convulsivante Utilizada	Tecidos avaliados	Modulação nos Parâmetros oxidativos	Efeitos anticonvulsivantes observados	Referências
Ácido lipóico	Ratos Wistar machos	20 mg/kg i.p.	Dose única	Pilocarpina	Estriado	↓danos a lipídeos, ↓NO, ↑SOD, ↑CAT e ↑glutaciona peroxidase	↑latência para iniciar a convulsão, ↓n° de convulsões	Militão <i>et al.</i> , 2010
α- tocoferol	Ratos Wistar machos	200 mg/kg i.p.	Dose única	Pilocarpina	Hipocampo	↓danos a lipídeos, ↓NO, ↑SOD e ↑CAT	↑latência para iniciar a convulsão, ↓n° de convulsões	Tomé <i>et al.</i> , 2010
Curcumina	Ratos Wistar Machos	2 g/kg por gavagem	Dose única	PTZ	Cérebro e cerebelo	↓danos a lipídeos, ↓CAT e ↓glutaciona	n.a.	Sharma <i>et al.</i> , 2010
Grelina	Ratos Wistar machos	20, 40, 60, 80mg/kg i.p.	Dose única	PTZ	Cérebro, fígado e eritrócitos	↓danos a lipídeos, ↑SOD, ↑CAT, ↑glutaciona	n.a.	Obay <i>et al.</i> , 2008
Isopulegol	Ratos Wistar machos	100 e 200 mg/kg i.p.	Dose única	PTZ	Hipocampo	↓danos a lipídeos, ↑CAT, ↑glutaciona,	↑ latência para iniciar a convulsão (apenas a dose de 200 mg/kg)	Silva <i>et al.</i> , 2009
Resveratrol	Ratos Wistar machos	15 mg/kg por	Durante 10 dias	Cainato	-	n.a.	↓n° de convulsões e	Wu <i>et al.</i> , 2009

		gavagem					↓perda de neurônios.	
Rutina	Ratos Wistar machos	25, 50 e 150 nM i.c.v.	Dose única	PTZ	-	n.a.	↑latência para iniciar a convulsão e ↓ mortalidade	Nassiri-Asl <i>et al.</i> , 2008
Vitamina C	Ratos Wistar machos	250 mg/kg i.p.	Dose única	Pilocarpina	Hipocampo	↓danos a lipídeos e ↑CAT	↑latência para iniciar a convulsão, ↓convulsões e ↓ mortalidade	Xavier <i>et al.</i> , 2007
Topiromato + Vitamina E	Ratos Wistar machos	50 mg/kg + 150 mg/kg por gavagem	Durante 7 dias	PTZ	Cérebro e Eritrócitos	↓ danos a lipídeos, ↓ NO, ↑ glutathiona peroxidase e redutase	↓ n° de descargas elétricas	Naziroglu <i>et al.</i> , 2009

Legenda: n.a. = não avaliado; ↓ = diminuiu; ↑ = aumentou; i.p.= intraperitoneal; i.c.v. = intracerebroventricular; SOD = superóxido dismutase; CAT = catalase; PTZ = pentilenotetrazol.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

6.1 O suco de uva orgânico apresentou maior concentração de compostos fenólicos totais, antocianidinas, catequina, epicatequina, procianidina B1 e resveratrol do que o suco convencional.

6.2 Não foram observadas alterações no comportamento (ansiedade, capacidade locomotora e exploratória) dos ratos Wistar tratados com os sucos de uva orgânico e convencional.

6.3 Os sucos de uva orgânico e convencional, nas concentrações estudadas, não apresentaram efeito anticonvulsivante em ratos Wistar.

6.4 O suco de uva orgânico e o suco convencional minimizaram os danos oxidativos a lipídeos e proteínas, o aumento no conteúdo de óxido nítrico e a diminuição das proteínas sulfidril induzidos por PTZ tanto nos tecidos cerebrais (hipocampo, cerebelo e córtex cerebral) como no fígado e no soro de ratos Wistar.

6.5 Ambos os sucos de uva (orgânico e convencional) evitaram a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes induzida por PTZ, no fígado e no soro de ratos Wistar. O suco de uva convencional, ao contrário do suco orgânico, não foi capaz de evitar a redução da atividade das enzimas SOD e CAT nos tecidos cerebrais.

7. PERSPECTIVAS

Como continuidade desse trabalho, seria importante:

1. Avaliar o efeito anticonvulsivante de diferentes doses de sucos de uva orgânico e convencional em tratamentos agudos e crônicos em ratos Wistar.
2. Determinar a atividade anticonvulsivante de compostos fenólicos isolados (tratamentos agudos e crônicos), em modelos experimentais de epilepsia em ratos Wistar.
3. Avaliar os efeitos do suco de uva orgânico e convencional em combinação com uma droga antiepiléptica em modelo de epilepsia em ratos Wistar, a fim de reduzir os danos oxidativos gerados pelas drogas.
4. Investigar a possível interação de compostos fenólicos presentes nos sucos de uva (orgânico e convencional) ao receptor GABA, utilizando uma droga antagonista a esse receptor.
5. Determinar a atividade de outros antioxidantes enzimáticos, tais como glutathione redutase e peroxidase, após a indução de convulsões em ratos Wistar pré-tratados com os sucos de uva orgânico e convencional.
6. Avaliar possíveis danos oxidativos em nível de DNA (micronúcleos e cometa) induzidos por convulsões, em ratos Wistar pré-tratados com os sucos de uva orgânico e convencional.
7. Quantificar o conteúdo de compostos fenólicos nos tecidos cerebrais, hepático e no soro de ratos Wistar, após a indução de convulsões em ratos Wistar pré-tratados com os sucos de uva orgânico e convencional.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. **Methods Enzymol.** 105:121-126.
- Akbas, S.H.; Yegin, A.; Ozben, T. (2005). Effect of pentylenetetrazol-induced epileptic seizure on the antioxidant enzyme activities, glutathione and lipid peroxidation levels in rat erythrocytes and liver tissues. **Clin. Biochem.** 38:1009-1014.
- Aksenov, M.Y.; Markesbery, W.R. (2001). Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neurosci. Lett.** 302:141-145.
- Aron, P.M.; Kennedy, J.A. (2008) Flavan-3-ols: Nature, occurrence and biological activity. **Mol. Nutr. Food. Res.** 52:79-104.
- Asami, D.K.; Hong, Y.; Barret, D.M.; Mitchell, A. E. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. **J. Agric. Food Chem.** 51:1237-1241.
- Aycicek, A.; Iscan, A. (2007). The effects of carbamazepine, valproic acid and phenobarbital on the oxidative and antioxidative balance in epileptic children. **Eur Neurol.** 57:65-69.
- Bannister, J.V.; Calabrese, L. (1987). Assays for Sod. **Methods Biochem. Anal.** 32:279-312.
- Benetti, M.R.N.; Rudnicki, M.; Zanotto Filho, A.; De Oliveira, M.R.; Kurek, A.G.; Coitinho, A.; Schwartsmann, G.; Moreira, J.C.F. (2007). Evaluation of antioxidant effect of extracts of *Symphyopappus casarettoi*. **Fitoterapia.** 78:232-234.
- Berg, A.T.; Berkovic, S.F.; Brodie, M.J.; Buchhalter, J.; Cross, J.H.; Van Emde Boas, W.; Engel, J.; French, J.; Glauser, T.A.; Mathern, G.W.; Moshé, S.L.; Nordli, D.; Plouin, P.;

- Scheffer, I.E. (2010). Revised terminology and concepts for organization of seizures and epilepsies: Report of the ILAE Commission on Classification and Terminology, 2005-2009. **Epilepsia**. 51:676-685.
- Bergamini, C.M.; Gambetti, S.; Dondi, A.; Cervellati, C. (2004). Oxygen, reactive oxygen species and tissue damage. **Curr. Pharm. Des.** 10:111-112.
- Bhat, T.K.; Singh, B.; Sharma, O.P. (1998). Microbial degradation of tannins - A current perspective. **Biodegradation**. 9:343-357.
- Blokhina, O.; Virolainen, E.; Fagerstedt, K.V. (2003). Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. **Annals Bot.** 91:179-194.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Disponível (online)** <http://www.agricultura.gov.br> (19 de abril de 2011).
- BRASIL. Ministério da Saúde (2010). **Disponível (online)** <http://portal.saude.gov.br> (20 dezembro de 2011).
- Bylund, J.; Brown, K.L.; Movitz, C.; Dahlgren, C.; Karlsson, A. (2010). Intracellular generation of superoxide by the phagocyte NADPH oxidase: How, where, and what for? **Free Radic. Biol. Med.** 49:1834-1845.
- Camargo, U.A.; Nachtigal, J.C. (2007). **Cultivares**. In: Nachtigal, J. C. & Schneider, E. P. (Ed.). **Recomendações para produção de videiras em sistemas de base ecológica**. Bento Gonçalves: Embrapa Uva e Vinho. 11-17.
- Cardey, B.; Foley, S., Enescu, M. (2007). Mechanism of Thiol Oxidation by the Superoxide Radical. **J. Phys. Chem. A**. 111 (50): 13046-13052.
- Castilla, P.; Echarri, R.; Davalos, A.; Cerrato, F.; Ortega, H.; Teruel, J.L.; Lucas, M.F.; Gómez-Coronado, D.; Ortuño, J.; Lasunción, M.A. (2006). Concentrated red grape juice exerts antioxidant, hypolipidemic, and antiinflammatory effects in both hemodialysis

- patients and healthy subjects. **Am. J. Clin. Nutr.** 84:252-262.
- Chakravarti, B.; Chakravarti, D.N. (2007). Oxidative modification of proteins: age- related changes. **Gerontology.** 53:128-139.
- Chong, M.F.F.; Macdonald, R.; Lovegrove, J.L. (2010). Fruit polyphenols and CVD risk: a review of human intervention studies. **Br. J. Nutr.** 104 Suppl 3:S28-39.
- Costello, D.J.; Delanty, N. (2004). Oxidative injury in epilepsy: potential for antioxidant therapy? **Expert Rev. Neurother.** 4(3):541-553.
- Dani, C.; Oliboni, L.S.; Vanderlinde, R.; Bonato, D.; Salvador, M.; Henriques, J.A. (2007). Phenolic content and antioxidant activities of white and purple juices manufactured with organically- or conventionally- produced grapes. **Food. Chem. Tóxicol.** 45:2574–2580.
- Dawson, T.M. & Dawson, V.L. (1995). Review: Nitric Oxide: Actions and Pathological Roles. **The Neuro. Scientist.** 1:7-18.
- Dillioglulil, M.O.; Kir, H.M.; Demir, C.; Ilbay, G.; Sahin, D.; Dillioglulil, O.; Bambal, G.; Mekik, H.; Ates, N. (2010). Effect of pentylenetetrazole and sound stimulation induced single and repeated convulsive seizures on the MDA, GSH and NO levels, and SOD activities in rat liver and kidney tissues. **Brain Res. Bull.** 83:356-359.
- Dong, F.Y.; Wu, J.; Tian, H.Y.; Ye, Q.M.; Jiang, R.W. (2011). Gallic acid pyridine monosolvate. **Acta. Crystallogr.** 67(11):3096.
- EMBRAPA. Dados da vitivinicultura 2010. **Disponível (online)** <http://www.cnpuv.embrapa.br/prodserv/vitivinicultura> (20 janeiro de 2012).
- Esterbauer, H.; Cheeseman, K.H. (1990). Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods Enzymol.** 186:407-21.
- Falkenberg, M.B; dos Santos, R.I.; Simões, C.M.O. (2001). **Introdução à Análise Fitoquímica.** In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; de Mello, J.C.P.; Mentz,

- L.A.; Petrovick. (Ed.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/ UFSC. p 165-181.
- Ferguson, L.R. (2001). Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutat. Res.** 475, 89-111.
- Ferri, P.H. (1996). **Química de Produtos Naturais: Métodos Gerais**. In: Di Stasi, L.C. (Ed.). *Plantas medicinais: Arte e Ciência, Um Guia de Estudo Interdisciplinar*. São Paulo: Universidade Estadual Paulista. p 129-156.
- Florian, M.L.; Vieira, V.; Bassuino, M.; Krai, J.S.; Schimit, R.; Benetti, M.R.; Schmidt, A.; Souza, D.O.; Tavares, R.G.; Coitinho, A.S. (2009). Avaliação da atividade Anticonvulsivante do extrato de *Symphyopappus casarettoi*. **Ciência em Movimento**. 11: 7-12.
- Fridovich, I. (1998). Oxygen toxicity: a radical explanation. **J. Exp. Biol.** 201 (Pt 8): 1203-1209.
- Galani, V.J.; Patel, B.G. (2010). Effect of hydroalcoholic extract of *Sphaeranthus indicus* against experimentally induced anxiety, depression and convulsions in rodents. **Int. J. Ayurveda Res.** 1(2): 87-92.
- Green, L.C.; Tannenbaum, S.R.; Goldman, P. (1981). Nitrate synthesis in the germ free and conventional rat. **Science**. 212:56–58.
- Halliwell, B.; Gutteridge, J.M.C. (2007). **Free Radicals in Biology and Medicine**. 3rd. ed. New York: Editora Oxford.
- Hansen, J.T.; Koepfen, B.M. (2002). **Atlas of neuroanatomy and neurophysiology. Selections from the Netter Collection of Medical Illustrations**. Special ed. Icon

Custom Communications, U.S.A.

Harrison, T.R.; Fauci, A.S. (2008). **Harrison's principles of internal medicine**. 17.ed. New York: McGraw-Hill Medical.

Holzmann I.; Cechinel Filho V.; Mora T.C.; Cáceres A.; Martínez J.V.; Cruz S.M.; de Souza M.M. (2011). Evaluation of Behavioral and Pharmacological Effects of Hydroalcoholic Extract of *Valeriana prionophylla* Standl. From Guatemala. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2011: 1-9.

IBRAVIN – Instituto Brasileiro do Vinho. **Disponível (online)** <http://www.ibravin.org.br> (17 de janeiro de 2010).

Ichai, P.; Huguet, E.; Guettier, C.; Azoulay, D.; Gonzalez, M.E.; Fromenty, B.; Masnou, P.; Saliba., F.; Roche, B.; Zeitoun, F.; Castaing, D.; Samuel, D. (2003). Fulminant hepatitis after grand mal seizures: mechanisms and role of liver transplantation. **Hepatology**. 38(2): 443-451.

IFOAM. International Federation of Organic Moviments (2011). **Disponível (online)** <http://www.ifoam.org> (22 de abril de 2011).

Ilhan, A.; Aladag, M.A.; Kocer, A.; Boluk A.; Gurel, A.; Armutcu, F. (2005). Erdosteine ameliorates PTZ-induced oxidative stress in mice seizure model. **Brain Res. Bul.**, 65: 495-499.

Kale, R. (2002). Global campaign against epilepsy: the treatment gap. **Epilepsia**. 43(6): 31-33.

Kammerer, D.; Claus, A.; Carle, R.; Schieber, A. (2004). Polyphenol Screening of Pomace from Red and White Grape Varieties (*Vitis vinifera* L.) by HPLC-DAD-MS/MS. **J. Agric. Food Chem.** 52:4360-4367.

- Kutluhan, S.; Nazıroğlu, M.; Celik, O.; Yılmaz, M. (2009). Effects of Selenium and Topiramate on Lipid Peroxidation and Antioxidant Vitamin Levels in Blood of Pentylentetrazol-Induced Epileptic Rats. **Biol. Trace Elem. Res.** 129:181-189.
- Kwan, P.; Brodie, M.J. (2000). Early Identification of Refractory Epilepsy. **N. Engl. J. Med.** 342 (5):314-319.
- Levine, R. L.; Garland, D.; Oliver, C.N.; Amici, A.; Climent, I.; Lenz, A.G.; Ahn, B.W.; Stadtman, E.R. (1990). Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. **Methods Enzymol.** 186:464-478.
- Li, C.; Yan, Z.; Yang, J.; Chen, H.; Li, H.; Jiang, Y.; Zhang, Z. (2010). Neuroprotective effects of resveratrol on ischemic injury mediated by modulating the release of neurotransmitter and neuromodulator in rats. **Neurochem. Int.** 56:495-500.
- Liga Brasileira de Epilepsia (LBE). **Disponível (online)** <http://www.epilepsia.org.br> (19 de novembro de 2011).
- Lombardi-Boccia, G.; Lucarini, M.; Aguzzi, A.; Capelloni, M. (2004). Nutrients and antioxidant molecules in yellow plums (*Prunus domestica* L.) from conventional and organic productions: a comparative study. **J. Agric. Food Chem.** 52: 90-94.
- López-Hernández, E.; Bravo, J.; Solís H. (2005). Epilepsia y antiepilépticos de primera y segunda generación. Aspectos básicos útiles en la práctica clínica. **Rev. Fac. Med.** 48 (5): 201-209.
- Löscher, W.; Potschka, H. (2005). Drug resistance in brain diseases and the role of the drug efflux transporters. **Nat. Rev. Neur.** 6: 591-602.
- Maldonado, A.; Ramos, W.; Pérez, J.; Huamán, L.A.; Gutiérrez, E.L. (2010). Convulsive status epilepticus: clinico-epidemiologic characteristics and risk factors in Peru. **Neurologia.** 25:478-484.

- Militão, G.C.; Ferreira, P.M.; De Freitas, R.M. (2010). Effects of lipoic acid on oxidative stress in rat striatum after pilocarpine-induced seizures. **Neurochem. Int.** 56(1):16-20.
- Mori, A.; Yokoi, I.; Noda, Y.; Willmore, L.J. (2004). Natural antioxidants may prevent posttraumatic epilepsy: a proposal based on experimental animal studies. **Acta Med. Okay.** 58(3):111-8.
- Muñoz-Espada, A.C.; Wood, K.V.; Bordelon, B.; Watkins, B.A. (2004). Anthocyanin quantification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch grapes and wines. **J. Agric. Food Chem.** 52: 6779-6786.
- Nassiri-Asl, M.; Shariati-Rad, S.; Zamansoltani, F. (2008). Anticonvulsive effects of intracerebroventricular administration of rutin in rats. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.** 32: 989-993.
- Naziroglu, M.; Kutluhan, S.; Uğuz, A.C.; Celik, O.; Bal, R.; Butterworth, P.J. (2009). Topiramate and Vitamin E Modulate the Electroencephalographic Records, Brain Microsomal and Blood Antioxidant Redox System in Pentylentetrazol-Induced Seizure of Rats. **J. Membrane Biol.** 229: 131-140.
- Nicoletti, I.; Bello, C.; De Rossi, A.; Corradini, D. (2008). Identification and Quantification of Phenolic Compounds in Grapes by HPLC-PDA-ESI-MS on a Semimicro Separation Scale. **J. Agric. Food Chem.** 56: 8801-8808.
- Nuutila, A.M.; Kammiovirta, K.; Oksman-Caldentey, K.M. (2002). Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. **Food Chem.** 76: 519-525.
- Obay, B. D.; Taşdemir, E.; Tümer, C.; Bilgin, H. M.; Atmaca, M. (2008). Dose dependent effects of ghrelin on pentylenetetrazole-induced oxidative stress in a rat seizure model. **Peptides.** 29:448-455.

- Ochoa, J.G. and Riche, W. Antiepileptic Drugs. Find in: <http://emedicine.medscape.com/article/1187334-print>. Accessed: Julho, 2011.
- Oga, Z. (2003). **Fundamentos de toxicologia**. 2.ed. Editora Atheneu, São Paulo. p. 39-44.
- Otten, J.J.; Hellwig, J. P.; Meyers, L.D. (2006). **DRI, dietary reference intakes: the essential guide to nutrient requirements**. Washington, D.C.: The National Academies Press.
- Oyegbile, T.O.; Bayless, K.; Dabbs, K.; Jones, J.; Rutecki, P.; Pierson, R.; Seidenberg, M.; Hermann B. (2011). The nature and extent of cerebellar atrophy in chronic temporal lobe epilepsy. *Epilepsia*. 52(4): 698-706.
- Pack, A. (2008). Bone health in people with epilepsy: Is it impaired and what are the risk factors? *Seizure*. 17:181-186.
- Park, Y.K.; Park, E.; Kim, J.S.; Kang, M.H. (2003). Daily grape juice consumption reduces oxidative DNA damage and plasma free radical levels in healthy Koreans. *Mutat. Res.* 529:77-86.
- Porto, L.A.; Siqueira, J.S.; Seixas, L.N.; Almeida, J.R.G.S; Quintans-Júnior, L. J. (2007). O papel dos canais iônicos nas epilepsias e considerações sobre as drogas antiepilépticas: uma breve revisão. *J. Epilepsy Clin. Neurophysiol.* 13(4):169-175.
- Racine, R.; Okujava, V.; Chipashvili, S. (1972). Modification of seizure activity by electrical stimulation. 3. Mechanisms. *Electroencephalogr. Clin. Neurophysiol.* 32(3):295-9.
- Radhakrishnan, K. (2009). Challenges in the management of epilepsy in resource-poor countries. *Nat. Rev. Neurol.* 5: 323-330.
- Reilly, C.; Agnew, R.; Neville, B.G.R. (2011). Depression and anxiety in childhood epilepsy: A review. *Seizure*. 20(8): 589-597.

- Ribeiro de Mello, L. M. (2010). Vitivinicultura brasileira: Panorama 2010. Embrapa: Artigos Técnicos. **Disponível (online)** <http://www.cnpuv.embrapa.br/publica/ano-2010.html> (12 de dezembro de 2011).
- Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donéche, B.; Lonvaud, A. (2003). **Tratado de Enología: microbiología del vino- vinificaciones**. Vol. 1. Buenos Aires: Editorial Hemisfério Sur. 636.
- Rizzon, L.A.; Link, M. (2006). Composição do suco de uva caseiro de diferentes cultivares. **Ciência Rural**. 36 (2): 689-692.
- Rombaldi, C.V.; Ferri, V.C.; Bergamasqui, M.; Luchetta, L.; Zanuzo, M. R. (2004). Produtividade e qualidade de uva, cv. Bordô (Ives), sob dois sistemas de cultivo. **R. bras. Agrociência**. 10(4):519-521.
- Scola, G.; Conte, D.; Spada, P.W.D.S.; Dani, C.; Vanderlinde, R.; Funchal, C.; Salvador, M. (2010). Flavan-3-ol compounds from wine wastes with in vitro and in vivo antioxidant activity. **Nutrients**. 2:1048-1059.
- Sharma, V.; Nehru, B.; Munshi, A.; Jyothy, A. (2010). Antioxidant potential of curcumin against oxidative insult induced by pentylenetetrazol in epileptic rats. **Methods Find. Exp. Clin. Pharmacol**. 32: 227–232.
- Silva, M.I.G.; Silva, M.A.; de Aquino Neto, M.R.; Moura, B.A.; de Sousa, H.L.; de Lavor, E.P.; de Vasconcelos, P.F.; Macêdo, D.S.; de Sousa, D.P.; Vasconcelos, S.M.; de Sousa, F.C. (2009). Effects of isopulegol on pentylenetetrazol-induced convulsions in mice: Possible involvement of GABAergic system and antioxidant activity. **Fitoterapia** 80: 506–513.
- Singleton, V.L.; Orthofer, R.; Lamuela-Raventós, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. In

- Methods in enzymology, oxidant and antioxidants (Part A)**; Packer, L., Ed; Academic Press: San Diego, CA. 299:159-178.
- Soleas, G.J.; Diamandis, E.P.; Goldberg, D.M. (1997). Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? **Clin. Biochem.** 30: 91-113.
- Sudha, K.; Ashalatha, V.R; Anjali R. (2001). Oxidative Stress and antioxidants in epilepsy. **Clin. Chim. Acta.** 303: 19-24.
- Tomé, A.R.; Feng, D.; Freitas, R.M. (2010). The Effects of Alpha-Tocopherol on Hippocampal Oxidative Stress Prior to in Pilocarpine-Induced Seizures. **Neurochem. Res.** 35:580-587.
- Valko, M.; Morris, H.; Cronin, M.T.D. (2005). Metals, toxicity and oxidative stress. **Current Med. Chem.** 12: 1161-1208.
- Weber, H.A.; Hodges, A.E.; Guthrie, J.R.; O'Brien, B.M.; Robaugh, D.; Clark, A.P.; Harris, R.K.; Agaier, J.W.; Smith, C.S. (2007). Comparison of proanthocyanidins in commercial antioxidants: grape seed and pine bark extracts. **J. Agric. Food Chem.** 55: 148-156.
- White, H.S.; Smith, M.D.; Wilcox, K.S. (2007). Mechanisms of action of antiepileptic drugs. **Int. Rev. Neurobiol.** 81:85–110.
- World Health Organization (WHO). (2011). Health topics: Epilepsy. **Disponível (online):** <http://www.who.int/topics/epilepsy/en/> (9 maio de 2011).
- Wu, Z.; Xu, Q.; Zhang, L.; Kong, D.; Ma, R.; Wang, L. (2009). Protective Effect of Resveratrol against Kainate-induced Temporal Lobe Epilepsy in Rats. **Neurochem. Res.** 34:1393-1400.
- Xavier, S.M.; Barbosa, C.O.; Barros, D.O.; Silva, R.F.; Oliveira, A.A.; Freitas, R.M. (2007). Vitamin C antioxidant effects in hippocampus of adult Wistar rats after seizures and status epilepticus induced by pilocarpine. **Neurosci. Lett.** 420(1):76-9.

- Xia, E.Q.; Deng, G.F.; Guo, Y.J.; Li, H.B. (2010). Biological Activities of Polyphenols from Grapes. **Int. J. Mol. Sci.** 11:622-646.
- Yatin, S.M.; Varadarajan, S.; Butterfield, D.A. (2000). Vitamin E prevents Alzheimer's amyloid beta-peptide (1-42)-induced neuronal protein oxidation and reactive oxygen species production. **J. Alzheimers Dis.** 2:123-131.
- Zelko, I.N.; Mariani, T.J.; Folz, R.J. (2002). Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the CU-Zn-SOD (SOD1), Mn-SOD (SOD2) and EC-SOD (SOD3) gene structure, evolution and expression. **Free Radic. Biol. Med.** 33(3): 337-49.
- Zoppi, C.C.; Antunes-Neto, J.; Catanho, F.O.; Goulart, L.F.; Motta e Moura, N.; De Macedo, D.V. (2003). Alterações em biomarcadores de estresse oxidativo, defesa antioxidante e lesão muscular em jogadores de futebol durante uma temporada competitiva. **Rev. paul. Educ. Fís.**, 17(2):119-30.

9. ANEXOS

ANEXO I

**PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO UNIVERSITÁRIO METODISTA - IPA**



Centro Universitário
METODISTA
IPA

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO

Data da aprovação: 16/09/2009

Protocolo CEP nº 298/2009

Projeto: Atividade anticonvulsivante e antioxidante de suco de uva bordô

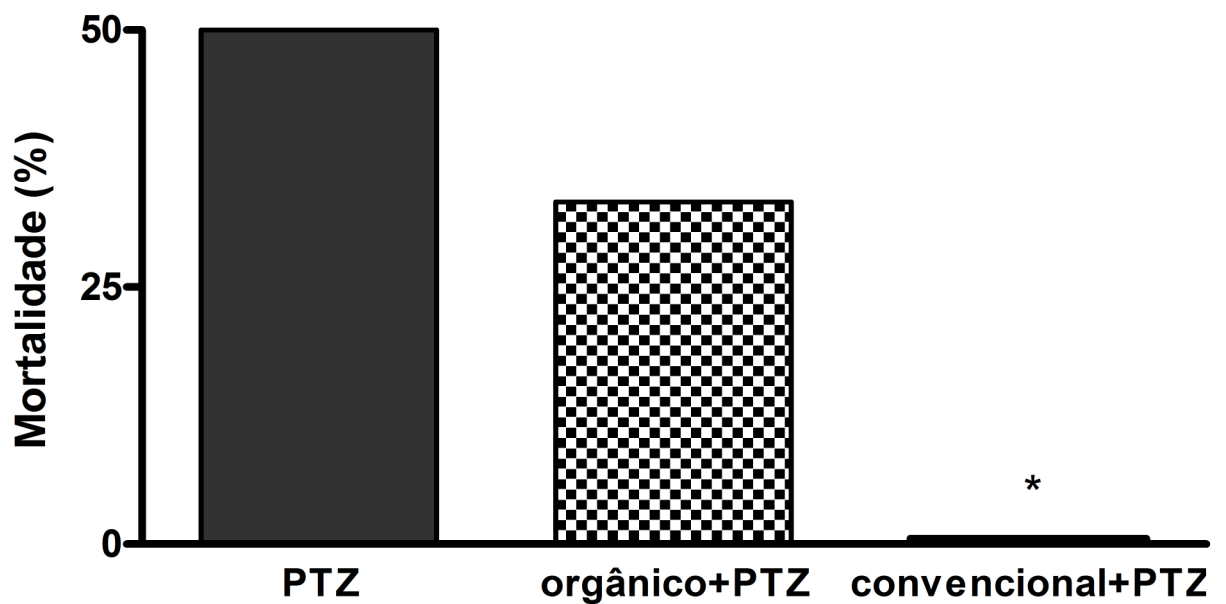
Pesquisador Responsável: Caroline Dani

Este projeto está de acordo com as normas éticas do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Universitário Metodista e conforme a Resolução CNS nº 196/96.

Magda Ambros Cammerer
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Profª Magda Ambros Cammerer
Coord. Comitê de Ética em Pesquisa IPA

ANEXO II



Efeitos do pentilenotetrazol (PTZ) sobre a mortalidade de ratos Wistar tratados com ou sem suco de uva orgânico ou convencional. * Indica diferença estatística significativa após análise de variância (ANOVA) com post-hoc test de Tukey ($p \leq 0.05$).

ANEXO III

Adriana Dalpicolli Rodrigues

Curriculum - 2012

Dados Pessoais

Nome Adriana Dalpicolli Rodrigues
Filiação Clodoveu Rodrigues e Vilma Dalpicolli Rodrigues
Nascimento 20/06/1986 - Caxias do Sul/RS - Brasil
Email adry.dr@gmail.com

Formação Acadêmica/Titulação

2009-2012 Mestre em Biotecnologia.
 Universidade de Caxias do Sul, UCS, Caxias Do Sul, Brasil
 Título: ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTICONVULSIVANTE DE SUCO DE UVA BORDÔ E SEU EFEITO NO COMPORTAMENTO DE RATOS WISTAR
 Orientador: Mirian Salvador
 Bolsista do(a): Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)

2004 - 2007 Graduação em Biomedicina.
 Universidade Feevale, FEEVALE, Novo Hamburgo, Brasil
 Título: Comparação das técnicas de Captura Híbrida e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas
 Orientador: Vlademir Vicente Cantarelli, PhD

2001 - 2003 Ensino Médio (2º grau).
 Colégio Madre Imilda, MI, Brasil

1993 - 2000 Ensino Fundamental (1º grau).
 Colégio Madre Imilda, MI, Brasil

Formação complementar

2010 Proficiência em inglês; Universidade de Caxias do Sul

2009-2010 Inglês.
 Particular, PARTICULAR, Brasil

1998 - 2002 Curso de curta duração em Inglês (básico, intermediário e avançado).
 College Instituto de Idiomas, CII, Brasil

Atuação profissional

1. Microlab Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas

Vínculo institucional

2011 - Atual Vínculo: Funcionária , Enquadramento funcional: Biomédica , Carga horária: 44h

Atividades

09/2011 - Atual Outra atividade técnico-científica, Microlab Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas

Especificação: Responsável pelos setores de hematologia, uroanálise, parasitologia, microbiologia e microscopia em geral (secreções, exame micológico direto, espermograma, etc), liberação de laudos e coletas de sangue.

2. Universidade de Caxias do Sul - UCS

Vínculo institucional

2010 - 2010 Vínculo: Estágio em Docência , Enquadramento funcional: Estagiária em Docência , Carga horária: 3, Regime: Parcial

2009 - 2012 Vínculo: Mestranda , Enquadramento funcional: Bolsista de mestrado, Carga horária: 40, Regime: Integral

2008 - 2009 Vínculo: Estágio , Enquadramento funcional: Estagiária Voluntária , Carga horária: 9, Regime: Parcial

Atividades

08/2010 - 12/2010 Estágio, UCS

Estágio: em Docência na disciplina Bioquímica com a Prof. Dra. Mirian Salvador; ministrando aulas para pequenos grupos de alunos de graduação, esclarecendo dúvidas, aplicando e corrigindo exercícios.

11/2008 - 09/2009 Estágio, UCS

Estágio: com participação em seminários (9 horas) e apresentação do seminário alfa-tocoferol-L-ascorbato-2-O-fosfato diester, a hydroxil radical scavenger, prevents the occurrence of epileptic foci in a rat model pos-traumatic epilepsy

3. Escola Municipal de Ensino Fundamental Vereador Marcial Pisoni - VMP

Vínculo institucional

2010 - 2011 Vínculo: Professor voluntário , Enquadramento funcional: Professor voluntário , Carga horária: 10, Regime: Parcial

4. Pró-Análise Laboratório de Análises Clínicas - PALAC

Vínculo institucional

2008 - 2009 Vínculo: Funcionária , Enquadramento funcional: Biomédica , Carga horária: 44, Regime: Dedicção Exclusiva

2007 - 2008 Vínculo: Estagiária , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 25, Regime: Parcial

Atividades

04/2008 - 04/2009 Outra atividade técnico-científica, Pró-Análise Laboratório de Análises Clínicas
Especificação: Responsável pelos setores de hematologia, uroanálise, parasitologia e microscopia em geral (secreções, exame micológico direto, espermograma, etc), liberação de laudos e mais raramente coletas.

05/2007 - 01/2008 Estágio, Pró-Análise Laboratório de Análises Clínicas

Estágio: nas áreas de: hematologia, uroanálise, parasitologia, microscopia em geral, coleta de sangue e triagem de materiais biológicos.

01/2007 - 02/2007 Estágio, Pró-Análise Laboratório de Análises Clínicas
Estágio: Temporário e voluntário, atuando nas áreas de: coleta de sangue, triagem de materiais biológicos, equipamento de hematologia Sysmex KX-21N, microscopia em uroanálise, parasitologia e mais raramente hematologia.

5. Universidade Feevale - FEEVALE

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Estágio Curricular , Enquadramento funcional: Estagiária , Carga horária: 25, Regime: Parcial

2006 - 2007 Vínculo: Livre , Enquadramento funcional: Monitoria e Pesquisa , Carga horária: 12, Regime: Parcial

Atividades

05/2007 - 07/2007 Projetos de pesquisa, Feevale
Participação em projetos: Associação entre a variabilidade em genes do sistema imunológico e lesões cervicais pré-malignas relacionadas ao HPV

02/2007 - 07/2007 Estágio, Feevale
Estágio: no Laboratório de Biomedicina (450 horas) e no Exame (420 horas) em: Coleta, Líquidos Corporais, Hematologia, Bacteriologia, Micologia, Imunologia, Bioquímica, Parasitologia e Controle de Qualidade. Estágio em Perfusão (CEC) no Hospital Santa Casa

02/2006 - 12/2007 Outra atividade técnico-científica, Feevale
Especificação: Monitora de Bioquímica Geral I e II dos Cursos de Biomedicina e Farmácia

6. Laboratorio Weinmann - WL

Vínculo institucional

2007 - 2007 Vínculo: Pesquisa, Enquadramento funcional: Pesquisa HPV (Trabalho de Conclusão de Curso) , Carga horária: 8, Regime: Parcial

Atividades

02/2007 - 06/2007 Projetos de pesquisa, Laboratório Weinmann
Participação em projetos: Comparação das Técnicas de Captura de Híbridos e PCR para a Detecção de Hpv em Amostras Clínicas

Projetos

2009-2012 Atividade antioxidante e anticonvulsivante de suco de uva Bordô e seu efeito no comportamento de ratos Wistar

Descrição: O suco de uva possui um importante papel econômico no Brasil, principalmente no estado do Rio Grande do Sul, grande produtor de uvas e derivados. Atualmente, podem ser encontrados sucos de uva orgânicos, em que o uso de agrotóxicos e engenharia genética no cultivo da uva são proibidos, e sucos convencionais, elaborados com uvas que recebem uma série de agroquímicos. Uma diferença significativa observada entre os dois tipos de suco é o conteúdo de compostos fenólicos, que é maior no suco orgânico. Esses

compostos podem apresentar importante atividade antioxidante, minimizando a incidência de diversas doenças relacionadas ao estresse oxidativo, como as neurodegenerativas, o câncer e a aterosclerose. A epilepsia é uma das doenças neurológicas mais comuns em todo o mundo e é caracterizada por crises convulsivas espontâneas e recorrentes. Essas crises podem aumentar o conteúdo de espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, desequilibrando o metabolismo redox de pacientes epiléticos. Em vista disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antioxidante e anticonvulsivante de sucos de uva Bordô, orgânico e convencional, e seus efeitos no comportamento de ratos Wistar. Em adição, foi determinado o conteúdo de compostos fenólicos totais e compostos majoritários de cada suco. Para a realização do estudo, ratos Wistar machos (n=48) com 3 meses de idade pesando em torno de 250-300g foram divididos em 3 grupos e tratados, por gavagem, com solução salina, suco de uva orgânico ou convencional, durante 17 dias (tempo determinado de acordo com teste piloto). No 18º dia, as possíveis mudanças no comportamento (ansiedade, capacidade locomotora e exploratória) dos animais foram avaliadas pelo teste de Campo Aberto. A seguir, metade dos ratos de cada grupo recebeu uma dose única da droga convulsivante pentilenotetrazol (PTZ) e foram observados durante 30 minutos para avaliação das características convulsivas (tempo de latência para início da convulsão, tempo de convulsão tônico-clônica, tempo de convulsão total, número de convulsões e número de animais que chegaram ao nível cinco da escala de Racine, o tipo mais severo de crise convulsiva). Avaliou-se, ainda, a taxa de mortalidade em cada grupo. A seguir, os animais foram eutanasiados por decapitação e as estruturas cerebrais (córtex cerebral, cerebelo e hipocampo), fígado e sangue foram coletados para avaliação do metabolismo redox (danos oxidativos a lipídios e proteínas, conteúdo de óxido nítrico, atividade das enzimas superóxido dismutase e catalase e conteúdo de proteínas sulfidril). Os resultados mostraram que o tratamento com os sucos não alterou o comportamento dos ratos e não foi capaz de minimizar as convulsões induzidas por PTZ. Observou-se, no entanto, que o tratamento com suco convencional evitou a morte dos animais induzida por PTZ, enquanto que com o suco orgânico a mortalidade foi reduzida para 33%. Por outro lado, ambos os sucos evitaram os danos oxidativos a lipídios e proteínas, bem como o aumento no conteúdo de óxido nítrico no sistema nervoso central (SNC), fígado e soro dos ratos. Observou-se, ainda, que o tratamento com os sucos evitou a depleção de proteínas sulfidril em todos os tecidos estudados. O suco orgânico foi capaz de evitar, também, a depleção da atividade das enzimas antioxidantes superóxido dismutase e catalase em todos os tecidos. Já o suco convencional evitou a diminuição da atividade das enzimas antioxidantes induzida por PTZ apenas no fígado e soro dos ratos tratados. Observou-se, ainda, que o suco orgânico apresentou maior concentração de compostos fenólicos totais, catequina, epicatequina, antocianinas, procianidina B1 e resveratrol do que o suco convencional, fator que pode ter influenciado nos resultados obtidos neste trabalho. Portanto, os resultados obtidos neste estudo abrem portas para o desenvolvimento de novas estratégias terapêutica para o tratamento da epilepsia afim de aumentar a qualidade e a expectativa de vida de indivíduos portadores da doença, além de contribuir para o aumento do valor agregado do suco de uva, favorecendo a vitivinicultura nacional.

2007 - 2007 Comparação das Técnicas de Captura Híbrida e PCR para a Detecção de Hpv em Amostras Clínicas

Descrição: Introdução: O papilomavírus humano (HPV) é um vírus DNA, transmitido sexualmente. São conhecidos mais de 100 tipos de HPV e cerca de 30 tipos possuem tropismo pelo epitélio escamoso do trato genital inferior. A infecção tem importância clínica, pois alguns tipos virais estão associados com lesões que podem progredir para o câncer cervical. O diagnóstico da infecção baseia-se na detecção do HPV por métodos morfológicos e moleculares. Objetivo: Comparar a detecção de HPV alto risco pelo método de Captura Híbrida 2 (CH2) com a detecção do vírus pela PCR convencional (PCRc) e PCR em Tempo Real (PCR-TR). Materiais e Métodos: Foram analisadas

56 amostras utilizando as técnicas de CH2, PCRc e PCR-TR, a partir do material restante, após a execução da CH2. Resultados: As técnicas de PCRc e PCR-TR apresentaram alta concordância entre si (95,1%), enquanto a comparação entre as PCR e a técnica de CH2 mostrou concordância razoável entre os resultados (90,2% e 87,8%, PCRc e PCR-TR, respectivamente). Discussão e Conclusão: Devido à técnica de CH2 ser demorada, só detectar HPV alto risco, e gerar resultados falso-positivos, o PCR, por sua maior sensibilidade, poderia ser um método de escolha para detecção de HPV. O PCR-TR é tão sensível e específico quanto o PCRc, além disso, é mais rápido. Conclui-se que as técnicas estudadas são eficazes para a detecção de HPV e que há possibilidade do uso de técnicas de PCR para a detecção do HPV em amostras genitais.

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa Integrantes: Adriana Dalpicolli Rodrigues (Responsável); Miriam Alice Frantz; Vlademir Vicente Cantarelli; Fabiana Pereira; Diogo Pielger

2007 - 2007 Associação entre a variabilidade em genes do sistema imunológico e lesões cervicais pré-malignas relacionadas ao HPV

Descrição: O papel do vírus do Papiloma Humano na carcinogênese do câncer cervical e de suas lesões precursoras já é bem estabelecido. Fatores genéticos ligados à imunidade são essenciais para o entendimento de associações do vírus com as células do hospedeiro. Estudos demonstram uma clara relação da atuação de vírus do HPV (16, 18, 31, 33, 35, 45, 51, 52 e 56) no hospedeiro levando ao desenvolvimento de lesões pré-malignas e também uma forte influência de fatores imunológicos e genéticos no mecanismo de ação viral. Muitas pesquisas vêm obtendo resultados no que diz respeito aos genes MHC, principalmente os genes HLA (antígeno leucocitário humano) que desempenham um papel importante na regulação do sistema imune. Os genes HLA são divididos em genes HLA de Classe I (HLA A, B e C) e genes HLA de Classe II (HLA-DR, DP e DQ). Poucos estudos foram feitos avaliando a associação entre HLA de Classe I e lesões pré-malignas da cérvix, mesmo conhecendo seu potencial. O entendimento dos mecanismos de defesa contra o vírus, depende de um maior conhecimento destes genes. Neste sentido, o projeto pretende acrescentar às pesquisas atuais, dados seguros sobre o envolvimento do HLA de classe I na carcinogênese induzida pelo HPV, estudando sua variabilidade em uma população de mulheres acometidas por lesões de alto grau de cérvix e carcinoma invasivo. Por se tratar de um tema abordado na disciplina de Citopatologia do curso de biomedicina, além da disciplina de Genética, o projeto tem vínculo com a graduação.

Situação: Concluído Natureza: Pesquisa Integrantes: Adriana Dalpicolli Rodrigues; Muitos outros; Miriam Alice Frantz (Responsável); Vlademir Vicente Cantarelli

Produção em C, T& A

Produção bibliográfica

Artigos completos publicados em periódicos

1. Rodrigues AD, Scheffel TB, Scola G, Santos MT, Fank B, de Freitas SC, Dani C, Vanderlinde R, Henriques JA, Coitinho AS, Salvador M. Neuroprotective and anticonvulsant effects of organic and conventional purple grape juices on seizures in Wistar rats induced by pentylene tetrazole. *Neurochem Int.* 2012. DOI: 10.1016/j.neuint.2012.01.009

2. Rodrigues, Adriana Dalpicolli, Cantarelli, Vlademir Vicente, Frantz, Miriam Alice, Pilger, Diogo André, Pereira, Fabiana de Souza. Comparação das técnicas de captura de híbridos e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (Impresso)*. , v.45, p.457 - 462, 2009.

Trabalhos publicados em anais de eventos (resumo)

1. NETO, C. I., RODRIGUES, A. D., CALICE, C., FLORIAN, M., TOMÉ, J., TONINI, Gabriela, FRANTZ, M. A. Casos raros de neoplasias malignas de mama In: Feira de Iniciação Científica e Salão de Extensão, 2006, Novo Hamburgo. **Feira de Iniciação Científica e Salão de Extensão**. 2006.

2. RODRIGUES, A. D., NETO, C. I., CALICE, C., FLORIAN, M., TOMÉ, J., TONINI, Gabriela, FRANTZ, M. A. Casos raros de neoplasias malignas de mama In: II Congresso Sul Brasileiro de Biomedicina e VI Semana Gaúcha de Biomedicina, 2006, Novo Hamburgo. **II Congresso Sul Brasileiro de Biomedicina e VI Semana Gaúcha de Biomedicina.** , 2006.

Apresentação de Trabalho

1. ANGHINONI, J. C., RODRIGUES, A. D., DANI, C., SPADA, P. K. W. D. S., SALVADOR, M. Atividade Antioxidante de Annona Muricata (Graviola) em Cultura de Linfócitos Humanos, 2010. (Congresso,Apresentação de rabalho)
2. RODRIGUES, A. D., SCOLA, G., SCHEFFEL, T. B., HENRIQUES, J. A. P., SALVADOR, M. Atividade Antioxidante de Suco de Uva Bordo em Fígado de Ratos Wistar, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
3. SANTOS, M. T., FREITAS, S. C. V., FANK, B., RODRIGUES, A. D., SOLARI, J. I. G., SCOLA, G., DANI, C., SALVADOR, M., COITINHO, A. S. Avaliação do tratamento crônico com suco de uva no modelo animal de convulsão induzido pelo pentilenotetrazol, 2010. (Outra,Apresentação de Trabalho)
4. RODRIGUES, A. D., SCOLA, G., SCHEFFEL, T. B., HENRIQUES, J. A. P., SALVADOR, M. Purple Grape Juice Avoids Lipid and Protein Oxidative Damages in Rats' Liver, 2010. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
5. RODRIGUES, A. D., CANTARELLI, V. V., FRANTZ, M. A. Comparação das Técnicas de Captura híbrida e PCR para a detecção de HPV em amostras clínicas, 2007. (Outra,Apresentação de Trabalho)
6. RODRIGUES, A. D., CALICE, C., NETO, C. I., TONINI, Gabriela, FLORIAN, M., TOMÉ, J. Casos Raros de Neoplasias Malignas de Mama, 2006. (Congresso,Apresentação de Trabalho)
7. NETO, C. I., CALICE, C., RODRIGUES, A. D., FLORIAN, M., TONINI, Gabriela, TOMÉ, J. Casos Raros de Neoplasias Malignas de Mama, 2006. (Outra,Apresentação de Trabalho)

Produção Técnica

Demais produções técnicas

1. Scola, Gustavo; COITINHO, A.; RODRIGUES, A. D. ; SALVADOR, M. . Processo de obtenção de extrato de uva com propriedade anticonvulsivante, extrato obtido, uso de extrato e composição compreendendo extrato com ação anticonvulsivante. Depósito de Pedido de Patente junto ao INPI. PI 1102311-2. 2011.
2. RODRIGUES, A. D. **Triagem de material biológico**, 11/2011 (Curso de curta duração em Material Biológico – da Coleta a Triagem, totalizando 4h/aula na Faculdade da Serra Gaúcha).
3. RODRIGUES, A. D. **Coleta e triagem de materiais biológicos**, 07/2011 (Curso de curta duração de Qualificação em Análises Clínicas, totalizando 18h/aula na Faculdade da Serra Gaúcha).
4. RODRIGUES, A. D. **Atividades biológicas do suco de uva**, 2010. (I Ciclo de Palestras da Biomedicina da Faculdade da Serra Gaúcha, totalizando 1 hora de duração)
5. RODRIGUES, A. D. **Hemograma: contagem e diferenciação celular**, 2010. (Curso de curta duração ministrado na Faculdade da Serra Gaúcha, totalizando 2 horas de duração)
6. RODRIGUES, A. D. **Oficina Laboratório de Ciências**; 2000-2010. (Curso ministrado na Escola de Ensino Fundamental Vereador Marcial Pisoni, totalizando 300h/aula)
7. RODRIGUES, A. D., TAVARES, Rejane, HERDEN, Fernanda, PERASSOLO, Magda, GAMARRO, Giovana **Polígrafo de Aulas Práticas de Bioquímica I e II**, 2007. (Desenvolvimento de material didático ou instrucional)

Eventos

Participação em eventos

1. **Venopunção e Fase Pré-Analítica**, 2011. (Treinamento realizado pelo Laboratório Hermes Pardini).
2. **Curso de Metodos de Extraccion y Analisis de Productos Bioactivos: Una Introduccion al Fraccionamiento Bioguiado**, 2011. (Outra – Universidade de Caxias do Sul)
3. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **III Congresso Internacional de Bioanálises, VI Congresso Sul-Brasileiro de Biomedicina, X Semana Gaúcha de Biomedicina**, 2010. (Congresso – Universidade Feevale)
Atividade Antioxidante de Suco de Uva Bordo em Fígado de Ratos Wistar.
4. Apresentação de Poster / Paineis no(a) **International Conference on Nutrigenomics (INCON) and 10 th International Conference On Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis (ICMAA)**, 2010. (Congresso). Purple Grape Juice Avoids Lipid and Protein Oxidative Damages in Rats' Liver.
5. Apresentação (Outras Formas) no(a) **III Seminário de Propriedade Intelectual - UCS**, 2009. (Seminário). III Seminário de Propriedade Intelectual.
6. Apresentação (Outras Formas) no(a) **4º Encontro de Patologia Clínica de Tecnologia Weinmann**, 2007. (Encontro)
7. Apresentação Oral no(a) **II Congresso Sul Brasileiro de Biomedicina e VI Semana Gaúcha de Biomedicina**, 2006. (Congresso – Universidade Feevale). Casos Raros de Neoplasias Malignas de Mama.
8. Apresentação (Outras Formas) no(a) **V SEMANA GAÚCHA DE BIOMEDICINA**, 2005. (Simpósio - Feevale).
9. Apresentação (Outras Formas) no(a) **II JORNADA DE INTEGRAÇÃO FARMACÊUTICA-BIOMÉDICA**, 2004. (Simpósio - Feevale)
10. Apresentação (Outras Formas) no(a) **IV SEMANA GAÚCHA DE BIOMEDICINA**, 2004. (Simpósio - Feevale)

Organização de evento

1. Muitos outros, RODRIGUES, A. D. **Campanha de Doação de Medula Óssea**, 2006. (Outro, Organização de evento – Universidade Feevale)
2. RODRIGUES, A. D., Muitos outros. **II Congresso Sul Brasileiro de Biomedicina e VI Semana Gaúcha de Biomedicina**, 2006. (Congresso, Organização de evento – Universidade Feevale)