

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

**Mirtilo, gênero *Vaccinium*, cv. Misty cultivado no Brasil:
caracterização química e atividade citotóxica em células de mamíferos**

GIOVANA MASSAROTTO

Caxias do Sul

2014

GIOVANA MASSAROTTO

**Mirtilo, gênero *Vaccinium*, cv. Misty cultivado no Brasil:
caracterização química e atividade citotóxica em células de mamíferos**

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. Mariana Roesch Ely

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a. Joséli Schwambach

Caxias do Sul

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Universidade de Caxias do Sul

UCS - BICE - Processamento Técnico

M414m Massarotto, Giovana, 1981-

Mirtilo, gênero *Vaccinium*, cv. Misty cultivado no Brasil: caracterização química e atividade citotóxica em células de mamíferos / Giovana Massaroto. - 2014.

118 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.

Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2014.

Orientador: Profa. Dra. Mariana Roesch Ely ; Coorientadora: Profa. Dra. Joseli Schwambach

1. Mirtilo. 2. Análise química. 3. Apoptose. 4. Biotecnologia. I.Título.

CDU 2.ed.: 582.688.3

Índice para o catálogo sistemático:

1. Mirtilo	582.688.3
2. Análise química	543.23
3. Apoptose	576.3
4. Biotecnologia	60

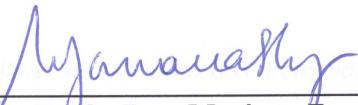
Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária
Carolina Machado Quadros – CRB 10/2236.

GIOVANA MASSAROTTO

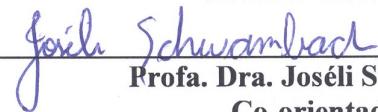
**Mirtilo (*Vaccinium* spp.) cv. Misty cultivado no Brasil:
caracterização química e atividade citotóxica em células de
mamíferos**

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

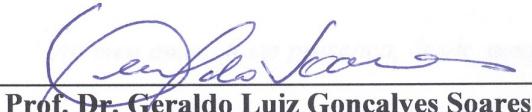
DISSERTAÇÃO APROVADA EM 17 DE DEZEMBRO DE 2014.



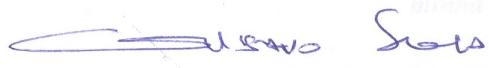
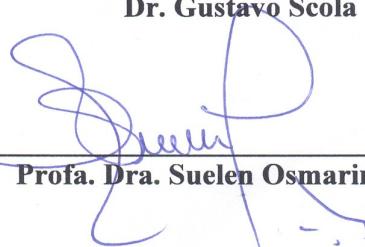
Profa. Dra. Mariana Roesch Ely
Orientadora



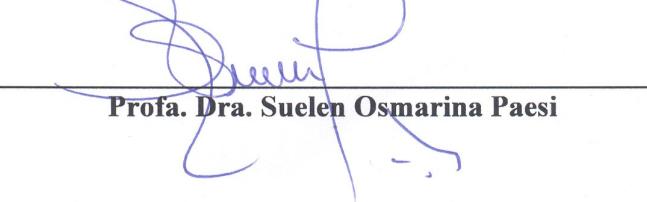
Profa. Dra. Joseli Schwambach
Co-orientadora



Prof. Dr. Geraldo Luiz Gonçalves Soares

Dr. Gustavo Scola



Profa. Dra. Suelen Osmarina Paesi

*Dedico este trabalho aos meus pais, Luiz e Severina, pelo carinho e
atenção durante toda a minha vida, por entenderem minhas
escolhas mesmo não concordando com elas, por tudo,
por me proporcionarem a oportunidade
de viver numa família.*

*Ao meu amor, foste presença, desde sempre, meu mestre, meu
incentivador pela busca do conhecimento, tu és
minha inspiração, meu orgulho, meu
grande amor, André.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a CAPES pelo apoio e pela bolsa para realização deste mestrado;

Agradeço a Deus por me dar forças para seguir todos os dias;

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Mariana Roesch Ely, é exemplo de profissional, de mestre, obrigada pela confiança e por permitir que eu fizesse parte da tua equipe;

Ao Prof. Dr. João Antonio Pêgas Henriques pelos conhecimentos adquiridos e pelo apoio constante ao nosso laboratório;

À minha co-orientadora Prof^a Dr^a Joséli Schwambach, pelos mirtilos e pelos conhecimentos compartilhados. Ao Dr. Thiago Barcellos, teu conhecimento foi transformador. Ao Prof. Dr. Sidnei Moura por permitir a realização das análises em seu laboratório;

Aos professores Dr. Aldo Dillon e Dr^a Suélen Paesi por aceitarem fazer parte da minha banca de acompanhamento, pelos conhecimentos compartilhados;

À minha coordenadara Ana Cristina Rechico, pela flexibilização da minha rotina de trabalho no Laboratório Unimed, permitindo que eu não deixasse de ser bioquímica para me tornar mestre;

Às minhas colegas do Laboratório de Genômica, Protômica e Reparo de DNA, o apoio e ajuda de vocês foi fundamental;

Às minhas amigas especiais, minhas amigas do CADÊ, minhas amigas do coração Ju, Beti, Fran e minha amiga irmã Greice, vocês são a extensão da minha família e quem carrego no meu coração aonde quer que eu esteja;

Meus pais, não há palavras para agradecer e expressar o que vocês significam e o quanto foram importantes durantes esses dois anos de tantas mudanças na minha vida. Minhas manas, Jomara e Janaína, meus cunhados, Ismael e Eduardo, meu sobrinho Luís que nem nasceu, mas já sabe de mirtilos, obrigada pelo apoio, por serem uma família de verdade.

Meu amor André, estiveste em todos os momentos, nos brindes pelos resultados bons, nas palavras de incentivo após resultados ruins, quanta felicidade compartilhada, quanto aprendi e aprendo contigo, obrigada pelo “mouse”, pelas conjunções, preposições e pela poesia que trazes à minha vida científica. Tu entendas o porquê disso tudo! Te amo!

ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS	VII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XII
RESUMO	XIV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO	18
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	22
2.1 Mirtilo (<i>Vaccinium</i> spp.).....	22
2.2 Composição química do mirtilo.....	25
2.3 Atividades biológicas do mirtilo.....	31
2.4 Considerações sobre carcinogênese e morte celular.....	39
3. OBJETIVOS	50
3.1 Objetivos específicos	50
4. RESULTADOS	51
4.1 CAPÍTULO I	
Cytotoxic activity on mammalian cells and chemical characterization of blueberry extracts (cv. Misty) cultivated in Brazil.....	52

4.2 CAPÍTULO II

Blueberry of cultivar Misty (Southern Highbush): cytotoxic activity and inducing of apoptosis in mammalian cells.....	80
5. DISCUSSÃO GERAL	99
6. CONCLUSÕES	107
7. PERSPECTIVAS	109
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Aspecto geral de uma produção de mirtilo na cidade de Vacaria (RS). (B) Aspecto geral da cultivar Misty. Fonte: Joséli Schwambach.....	23
Figura 2. Frutos de mirtilo das espécies (A) <i>Vaccinium corymbosum</i> (L.) (B) <i>Vaccinium ashei</i> Reade. Fonte: Pertuzatti et al. (2014).....	24
Figura 3. Estrutura básica das antocianidinas e as principais antocianinas encontradas na natureza.....	28
Figura 4. Esquema simplificado do equilíbrio químico das antocianidinas em relação ao pH.....	30

CAPÍTULO I

Figure 1. Anthocyanins commonly found in blueberries.....	71
Figure 2. Chromatogram profile at 520 nm of the anthocyanins present in blueberries collected in Southern Brazil, and expansion of the peaks 10 to 15. Peak numbers correspond to those indicated in Table 1.	72
Figure 3. Cell Survival (%) after 24 h treatment with ExtSB, ExtWB and ExtPB (mg.mL ⁻¹). The cells were treated with 0.005, 0.05, 0.15, 0.40, 0.65, 0.75, 1.00 mg.mL ⁻¹ of ExtWB and ExtSB, and 0.05, 0.15, 0.4, 0.625, 1.25 and 2.5 mg.mL-1 of ExtPB. Cell viability was assessed by MTT assay. Each bar represents the average percentage of cell survival ± SD relative.....	72

Figure 4. Percent of cells viably, in early apoptosis, late apoptosis and necrosis with AO/EB assay in MRC-5 (non-tumor cell) and HT-29 (tumor cell) treated and non-treated with ExtWB. Statistical differences between treated with IC50 and their untreated control, *p<0,01, **p<0,001 and ***p<0,0001.....73

Figure 5. Morphologically changes in HT-29 tumor cell fixed and stained with Giemsa and (first line) and with acridine orange/ethidium bromide (third line) and MRC-5 non-tumor cell stained with Giemsa (second line) and with acridine orange/ethidium bromide (fourth line) treated for 24 h with ExtWB at IC50 (mg.mL^{-1}) compared to negative control. Photomicrographs were taken under light microscopy (200x). The first column is a negative controls and the second column is cells lines treated,73

CAPÍTULO II

Figure 1. Effect of metanolic whole blueberry extract (ExtMB) on the cell viability (%) in tumor cell line Hep-2, HeLa and HT-29. Cells were treated with specific concentrations of ExtMB for 72 hours, and cell viability was determined by MTT assay. The values are represented as the percentage cell inhibition where vehicle treated cells were regarded as 100%. The data represents the mean \pm SD of three independent experiment each conducted in triplicate.....88

Figure 2. . Morphologically changes of cells treated for 72 h with ExtMB at IC50 ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) compared to negative control. Letters a, c, e and g indicate the negative controls, and letters b, d, f and h indicate different cell lines treated. Letters a, b: MRC-5

cell line. c, d: HT-29 cell line. e, f: HeLa cell line. g, h: Hep-2 cell line.

Photomicrographs were taken under light microscopy (200x).....91

Figura 3. Percent of cells viably, in early apoptosis, late apoptosis and necrosis with AO/EB assay in MRC-5 (non-tumor cell) and HT-29, HeLa and Hep-2 (tumor cells) treated with IC₅₀ ExtMB for 72 hours and their untreated control. Statistical differences between treated with IC₅₀ and their untreated control, *p<0.01, **p<0.001 and ***p<0.0001.....93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de Fenóis totais e Antocianinas em extrato de diferentes grupos de mirtilo.....	27
Tabela 2. Concentrações de compostos fenólicos e antocianinas em diferentes formas de extração.....	29
Tabela 3. Conteúdo de compostos fenólicos na casca, polpa e fruto inteiro de <i>Vaccinium ashei</i> Reade.....	33
Tabela 4. Avaliação do potencial citotóxico do extrato de <i>Vaccinium corymbosum</i> (L.) em células tumorais.....	36

CAPÍTULO I

Table 1. Structure identification of anthocyanins from skin and whole extract by ESI-QTOF MS/MS.....	74
Table 2. Structure identification of polyphenolic compounds identified in pulp and whole extract by ESI-QTOF MS/MS.....	75
Table 3. IC ₅₀ (mg.mL ⁻¹) after 24 h treatment with ExtSB, ExtWB and ExtPB in different cell lines. Cell viability was assessed by MTT assay.....	76

CAPÍTULO II

Table 1. Compounds identified in ExtMB of blueberry for by ESI-QTOF MS/MS.....87

Table 2. IC₅₀ values – 50% inhibitory concentration obtained in the MTT assay for tumor (HT-29, Hep-2, HeLa) and non-tumor cell (MRC-5) after 72 h treatment with metanolic whole blueberry extract (ExtMB).....88

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS ⁺	radical 2,2-azinobis(3-etylbenzotiazolina-6-sulfonato, sal de diamônio)
Apaf1	Fator adaptador ativador de protease-apoptótica
Bcl-2	B-celllymphomaproteinanti-apoptotic (proteína antiapoptotica do Linfoma de células B)
BE	Brometo de etídio
BER	Reparo por excisão de bases
DMEM	Meio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DR	Receptores de morte
DP	desvio padrão
ESI	ionização por <i>electrospray</i>
ExtMB	Extrato Metanólico do mirtilo inteiro
ExtPB	Extrato Hidroalcóolico da polpa do mirtilo Southern Highbush
ExtSB	Extrato Hidroalcóolico da casca do mirtilo Southern Highbush
ExtWB	Extrato Hidroalcóolico do mirtilo Southern Highbush inteiro
GC	Cromatografia gasosa
GAE	Gallic acid equivalents
HO [·]	radical hidroxila
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50% do crescimento celular
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LA	Laranja de acridina
MMR	Reparo por mal pareamento

MS	Espectrometria de massas
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5difeniltetrazólico
MTS	(salde 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxipenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio)
NER	Reparo por excisão de nucleotídeos
NC	Carolina do Norte
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	tampão fosfato salino
ROS	Substâncias reativas ao oxigênio
SFB	Soro fetal bovino
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNFR1	Receptor 1 do Fator de Necrose Tumoral
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>

RESUMO

O mirtilo é um fruto originário da região sul dos Estados Unidos, caracterizada pela presença de clima temperado e foi introduzido no Brasil a partir dos anos 1980. Atualmente, Vacaria (RS) é a cidade com maior produção do fruto no Brasil, isso se dá principalmente pela localização geográfica montanhosa numa região de clima bastante frio, nos Campos de Cima da Serra. Os mirtilos são conhecidos por serem ricos em antocianinas, substância localizada na casca do fruto e que está associada à importante atividade antioxidante, com redução do risco cardiovascular, atividade anti-inflamatória e antitumoral. Neste estudo, buscou-se caracterizar quimicamente os extratos hidroalcólicos obtidos do fruto inteiro e das frações da casca e polpa do fruto e do extrato metanólico do fruto inteiro de mirtilo da cultivar Misty, do grupo *Southern Highbush* por cromatografia líquida acoplada a espectrômetria de massas (GC-MS) com fonte de *electrospray* de alta resolução, acoplada a espectrômetro de massas (ESI-QTOF MS/MS) em modo negativo e positivo. A identificação química confirmou a presença de antocianinas nas amostras de casca e fruto inteiro dos extratos hidroalcólico e metanólico, sendo encontrados derivados da delphinidina, cianidina, peonidina, petunidina e malvidina, além de compostos polifenólicos como ácido clorogênico, quercetinas, proantocianidinas na polpa do extrato hidroalcólico e no fruto inteiro dos extratos hidroalcólico e metanólico. Todos os extratos analisados apresentaram menor citotoxicidade na linhagem não tumoral (MRC-5) e seletividade para linhagens tumorais (Hep-2, HeLa, HT-29), sendo que verificou-se menor atividade no extrato obtido da polpa em relação as demais amostras. Observou-se uma redução importante na viabilidade celular em linhagens tumorais com aumento do tempo de exposição (de 24h para 72h) ao extrato metanólico do fruto inteiro. Indução de apoptose foi observada após 24h e 72h de exposição aos

extratos hidrolcólico e metanólico por coloração de laranja de acridina e brometo de etídio, em que a maioria das linhagens tumorais apresentaram-se em estágios finais do processo de apoptose e necrose. A partir desses resultados, sugere-se que o extrato de mirtilo da cultivar Misty possui atividade biológica em células tumorais, porém mais estudos são necessários com a finalidade de entender os mecanismos envolvidos na citotoxicidade e comprovar a eficácia dessa espécie como possível agente antitumoral.

Palavras-chave: apoptose; antitumoral; análise química; mirtilo; Misty.

ABSTRACT

The blueberry is originally from southern United States which is, characterized by a temperate climate. It was subsequently introduced in Brazil in, 1980. Currently, Vacaria (RS) is the city with the largest fruit production in Brazil, this is mainly because of its geographic region of very cold weather in the mountains, in Campos de Cima da Serra. Blueberries are known to be rich in anthocyanins, a substance found in the skin of the fruit and is associated with significant antioxidant activity with cardiovascular risk reduction, anti-inflammatory activity and antitumor. Hydroalcoholic extracts of whole fruit and skin and pulp fractions of the fruit and the methanol extract of the whole fruit of fruits blueberry of the cultivar Misty were chemically characterized by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (ESI-HRMS) in negative mode. The chemical identification confirmed the presence of anthocyanins in samples of whole fruit and skin of methanolic and hydroalcoholic extracts, delphinidin, cyanidin, petunidin, malvidin being found, and polyphenolic compounds such as chlorogenic acid, quercetins, proanthocyanidins in the pulp of the hydroalcoholic extract and the whole fruit of the hydroalcoholic and the methanol extract. All the extracts analyzed showed lower cytotoxicity in non-tumor cell line (MRC-5) and selectivity to tumor cell lines (Hep-2, HeLa, HT-29), with less activity in the extract from the pulp in relation to the other samples analyzed. An important decrease in cell viability in tumor cell lines was observed when increasing time of exposure (from 24h to 72h) using methanol extract of the whole fruit. Induction of apoptosis was observed after 24h and 72h exposure to ethanol and methanol extract by ethidium bromide and acridine orange staining, where the majority of tumor lines showed increase in percentage at late apoptosis stages and

necrosis. The results here observed suggests that the extract of blueberry, Misty cultivar, presents biological activity in tumor cell lines, but further studies are needed to understand the mechanisms involved in cytotoxicity and evaluate the effectiveness of these species as possible antitumor agent are necessary.

Key words: apoptosis, antitumor, blueberry, chemical, cv. Misty.

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um país de múltiplas diversidades, geográfica, ecológica, biológica, e etnográfica. As paisagens culturais, fruto da ação do homem sobre o ambiente, também são muitas e variadas. Nesse sentido, a ciência precisa estar cada vez mais atenta e aberta às investigações das particularidades dos territórios - e dos saberes e fazeres - das paisagens naturais e culturais do país. O homem, com seu olhar e sua ação, plasma a superfície da terra e nela impõe - à luz de suas tradições e conhecimentos - métodos, modelos, modos de produzir, de evoluir e de viver. Assim, um processo de cultivo terá, em cada latitude do imenso território do país, inflexões e características diversas que precisam ser mapeadas e estudadas. Nesta perspectiva, o interesse deste estudo recai sobre o mirtilo da cultivar Misty obtida na região sul do Brasil, no planalto nordeste do Rio Grande do Sul, região conhecida por Campos de Cima da Serra. Trata-se da região mais alta e fria do Rio Grande do Sul.

É de conhecimento que a ciência enfrenta inúmeros desafios em suas pesquisas, entre os quais o novo cenário epidemiológico que surge progressivamente em escala mundial. Entre estes, desafios das enfermidades não transmissíveis como obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, cerebrovasculares, câncer e outras afecções degenerativas também seguem despertando crescente atenção. Isso, principalmente devido a redução da qualidade de vida da população acometida, com comprometimento da saúde física e mental, bem como o impacto econômico gerado.

Dessa forma, a utilização de produtos naturais, como alimentos funcionais e plantas medicinais em pesquisas para descoberta de novas drogas para prevenção e tratamento de patologias de grande interesse social tem se expandido. Os achados

envolvendo compostos naturais são de grande importância no âmbito farmacêutico. Estima-se que no período de 1981 a 2002, aproximadamente 50% dos fármacos aprovados pelo FDA (U.S. Food and Drug Administration) eram de origem ou derivados de vegetais, através da síntese ou semi-síntese (Newmann, 2003). Sendo assim, a presença de fármacos derivados de produtos naturais têm destaque entre os anticancerígenos, antimicrobianos e antivirais.

Assim, pesquisas em torno de novas formas farmacológicas são necessárias diante do crescente número de casos de câncer, sendo esta doença a segunda causa atual de morte entre a população mundial. Os estudos com plantas medicinais já possibilitaram a descoberta de vários fármacos para o tratamento do câncer, como exemplo os alcalóides vimblastina e vincristina, ambos isolados de *Catharanthus roseus* G., utilizadas respectivamente para linfomas e leucemias agudas (Cragg & Newman, 2005; Newman & Cragg, 2007). Diversos estudos têm demonstrado a existência de uma correlação positiva entre o uso de produtos naturais e a prevenção e/ou atraso na evolução do câncer (Kris-Etherton et al. 2002; Zafra-Stone et al. 2007). Dentre estes produtos, podemos destacar a utilização de espécies do gênero *Vaccinium*, como o mirtilo, com ações potencialmente benéficas à saúde. Nos países da América do Norte e Europa há estudos que comprovam a sua ação na melhora da função cognitiva, na redução do risco cardiovascular, no combate ao câncer, como antioxidante, agente anti-inflamatório, atuando na doença de Alzheimer e na modulação da obesidade e adiposidade.

Na literatura encontramos pesquisas sobre a composição química e as atividades biológicas do mirtilo produzido em diversos países, porém há um pequeno número de estudos realizados com o mirtilo cultivado no Brasil. Isso se deve ao fato de as

cultivares de *Vaccinium* spp. terem sido introduzidas recentemente no Brasil, na década de 1980. Estudos já realizados com o mirtilo produzido no Brasil evidenciam a presença de elevada concentração de compostos fenólicos, os quais compreendem ácidos fenólicos e flavonóides. Dentre os flavonóides, destaca-se a alta concentração de antocianinas.

Porém, cabe ressaltar que o conteúdo fenólico apresenta grande variabilidade qualitativa e quantitativa dependente de fatores intrínsecos (gênero, espécie e cultivar) e extrínsecos (condições ambientais e de cultivo, manejo e condições de armazenamento), além de fatores como métodos de extração e quantificação. Devido as particularidades de cada região, que podem gerar frutos com composições químicas diferenciadas e, consequentemente, atividades biológicas distintas, é de fundamental importância o estudo das cultivares plantadas regionalmente. Dentre as pesquisas já realizadas, evidenciou-se a presença de importante atividade antioxidant e antitumoral dos mirtilos das cultivares cultivadas no território brasileiro.

Seguindo essa abordagem, compostos extraídos a partir do mirtilo podem tornar-se uma alternativa às drogas atualmente utilizadas no tratamento dos casos de câncer. Os quimioterápicos disponíveis apresentam, em muitos casos, taxas de sucesso terapêutico limitadas, isso devido à concentração insuficiente da droga no local alvo, além de uma alta toxicidade sistêmica e ausência de seletividade, o que colabora para resistência dos tumores após tratamento prolongado (Christodoulou et al. 2013).

Outro aspecto que torna importante o estudo de novos agentes antitumorais é a colaboração gerada pelos estudos para o entendimento dos mecanismos relacionados à carcinogênese. Além da elucidação das possíveis vias metabólicas responsáveis pela atividade antitumoral, bem como dos compostos químicos associados à sinalização

celular, que induzem à parada do ciclo celular e consequentemente desencadeiam o processo bioquímico que leva à apoptose celular.

A apoptose, morte celular programada, que ocorre durante várias situações fisiológicas e patológicas no organismo dos animais superiores, desempenha um importante papel no processo vital, com a manutenção celular através de mecanismos de remoção de células lesadas. Sendo que, a ausência de apoptose pode estar associada a doenças celulares proliferativas, como é o caso do câncer. Estudos do ciclo celular com a utilização de marcadores relacionados a apoptose permitem uma melhor avaliação da indução à morte de células tumorais.

Diante do exposto, este trabalho visa avaliar a atividade biológica de extratos obtidos a partir de mirtilo da cultivar Misty pertencente ao grupo *Southern Highbush* cultivado na região nordeste do Rio Grande do Sul. Nesse sentido, buscou-se caracterizar quimicamente os extratos hidroalcoólicos do mirtilo por técnicas de espectrometria de massas e cromatografia. Além disso, verificou-se a atividade antitumoral *in vitro* destes extratos, comparar a citotoxicidade em cultura de células tumorais e não tumorais e avaliar a influência do extrato sobre características morfológicas e indutoras de apoptose celular.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Mirtilo

O mirtilo (*arandamo*, em espanhol, e *blueberry*, em inglês) é uma espécie frutífera pertencente à família *Ericaceae*, subfamília *Vaccinoideae* e gênero *Vaccinium*, nativa de regiões de clima temperado da América do Norte e Europa, onde é amplamente cultivado nos meses de verão e intensamente comercializado durante todo o ano (Silva et al. 2008; Pertuzatti et al. 2014; Reque et al. 2014). Assim, os Estados Unidos e o Canadá são os principais produtores e importadores de mirtilo, enquanto que o Chile é o principal exportador. O Chile exporta mais de 34.707 toneladas por ano, atividade esta, impulsionada a partir de 1980, com a necessidade comercial dos países do hemisfério norte durante o período de entressafra (Schnettler et al. 2011).

No Brasil, o fruto é ainda pouco conhecido e seu cultivo não é tão difundido (Pertuzatti et al. 2014). Sendo que as primeiras cultivares de mirtilo foram trazidas ao Brasil somente na década de 1980 pela EMBRAPA Clima Temperado (Pelotas – RS), que introduziu no país uma coleção de cultivares com baixa exigência em frio, pertencente ao grupo *Rabbiteye*, oriundas da Universidade da Flórida (Estados Unidos). Anos mais tarde, já na década de 1990 iniciou-se o plantio comercial na cidade de Vacaria (RS). Hoje, estima-se que a produção brasileira de mirtilo esteja em torno de 60 toneladas, concentradas nas cidades de Vacaria (RS), Caxias do Sul (RS), Barbacena (MG) e Campos do Jordão (SP), totalizando uma área de aproximadamente 35 hectares (Rasiera & Antunes 2004). E é na região dos Campos de Cima da Serra, mais precisamente na cidade Vacaria (RS), que se concentra a produção do fruto, favorecida pelas condições climáticas com presença de clima temperado, com inverno de

temperaturas muito baixas. Atualmente, o mirtilo vem apresentando alto valor agregado e grande potencial produtivo, com interesse na expansão do cultivo, no Brasil, para fins de exportação para os Estados Unidos, o Canadá e a Europa (Rasiera & Antunes 2004; Pertuzatti et al. 2014).

As plantas do gênero *Vaccinium* (Figura 1) apresentam uma grande disparidade de aspectos e dimensões sendo, a maioria, arbustos de pequeno porte. A produção máxima atinge o seu auge depois dos seis ou sete anos de idade (Fonseca & Oliveira 2007). Os arbustos produzem frutos, denominados de mirtilo, que amadurecem dois a três meses após a floração, apresentando-se baciformes e globosos, de formato achatado (Sousa et al. 2007), com diâmetro entre 8 e 22 mm (Antunes et al. 2008) e com aproximadamente 1,5 a 4 g de peso (Figura 2). Quando maduros adquirem coloração azul arroxeada e têm sabor agrioce. A baga apresenta em seu interior muitas sementes que contribuem para um sabor menos acentuado (Silveira et al. 2007).



Figura 1: (A) Aspecto geral de uma produção de mirtilo na cidade de Vacaria (RS). (B) Aspecto geral da cultivar Misty. **Fonte:** Joséli Schwambach.

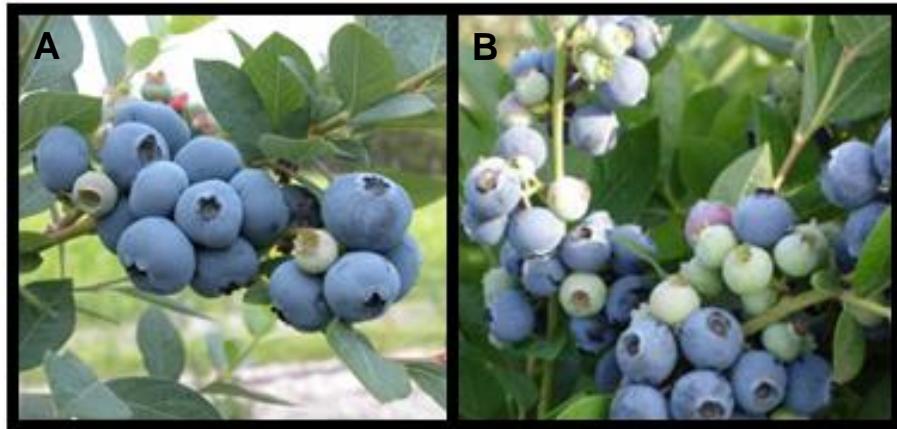


Figura 2: Frutos de mirtilo das espécies **(A)** *Vaccinium corymbosum* (L.) **(B)** *Vaccinium ashei* Reade.
Fonte: Pertuzatti et al. (2014).

Identificamos aproximadamente 400 espécies catalogadas do gênero *Vaccinium*, sendo muitas dessas com frutos comestíveis e com grande valor de mercado devido ao seu sabor exótico e propriedades medicinais (Galletta & Ballington 1996; Lee et. al. 2014). Dentre essas inúmeras espécies, existem apenas sete grupos nomeados: Lingongerry (*Vaccinium vitis-idaea* L.), Cranberry (*Vaccinium oxycoccus* L.) e cinco do grupo Cyanococcus: Lowbush (*Vaccinium angustifolium* Ait.), Rabbiteye (*Vaccinium ashei* Reade), Half-high (híbridos de *Vaccinium angustifolium* Ait. e *Vaccinium corymbosum* L.), Northern Highbush (*Vaccinium corymbosum* L.), e Southern Highbush (híbridos interespecíficos de *Vaccinium corymbosum* L.) (Galletta & Ballington 1996). No Brasil, devido as suas características menos exigentes, as cultivares de mirtilo mais produzidas pertencem ao grupo *Rabbiteye*. Estas apresentam elevado vigor, alta produtividade, boa tolerância ao calor e à seca, floração precoce, longo período entre floração e maturação e baixa exigência na estação fria (temperaturas abaixo de 7,2 °C). Elas são capazes de brotar e florescer com apenas 360 horas de frio (Raseira & Antunes 2004).

Já as cultivares do grupo *Southern Highbush*, originárias da região Sul dos Estados Unidos, são híbridos interespécíficos, com predominância da espécie *Vaccinium corymbosum* (L.), necessitam entre 650 e 800 horas de frio para produção. Os arbustos são de porte alto (Galletta & Ballington 1996), com produção de frutos mais precoces em relação aos outros grupos (Pagot 2006), têm elevada produtividade e os frutos grande qualidade comercial, com bagas grandes, coloração azul intensa, firmeza e sabor ácido agradável (Bremer et al. 2008). Pertencente ao grupo *Southern Highbush* temos a cultivar Misty, produzida e comercializada na cidade de Vacaria (RS), que foi desenvolvida na Universidade da Flórida em 1992, a partir do cruzamento entre a seleção FI 67-1 e a cultivar *Avonblue*. A cultivar Misty foi inicialmente comercializada na Flórida e Chile e posteriormente na Georgia, Espanha e Austrália, e muitos anos depois no Brasil (Skupien et al. 2006). Essa variedade necessita em torno de 300 horas de frio para desenvolvimento dos seus frutos, há uma abundância de floração e com presença de frutos de bagas grandes (Lyrene & Williamson 1997).

2.2 Composição química do mirtilo

O fruto inteiro do mirtilo contém em sua estrutura elevadas concentrações de compostos fenólicos, como catequinas, epicatequinas, miricetina, queracetina, *kaempferol* e ácido clorogênico (Johnson & Arjmandi 2013). Dentre os compostos fenólicos, os flavonóides constituem um importante subgrupo estruturalmente caracterizado pela presença de um esqueleto com 15 átomos de carbono na forma C6-C3-C6 que são divididos em classes dependendo do estado de oxidação do anel central de pirano (Djeradi et al. 2014). Um grupo de flavonóides pigmentados largamente distribuído na natureza e presentes na composição química de mirtilos consiste nas antocianinas (Fennema 1996; Triebel et al. 2012; Taiz & Zeiger 2013). Dentre outros

constituíntes dos mirtilos destacam-se flavonóis, flavonas, flavononas, flavanóis, isoflavonas, e proantocianidinas (Prior et al. 2001, Nicoue et al. 2007; Giovanelli & Buratti 2009; Vrhovsek et al. 2012).

Os compostos fenólicos são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas durante o desenvolvimento normal, em resposta a condições de estresse tais como infecções, ferimentos, radiação ultravioleta (UV), entre outras. Estes compostos estão presentes em todas as plantas, constituindo um grupo diversificado de metabólitos derivados da fenilalanina e tirosina (Naczk & Shahidi 2004). Nas espécies de mirtilo, os ácidos ferúlico e caféico ligados a açucares são identificados (Gavrilova et al. 2011). Dentre os ácidos fenólicos, são encontrados frequentemente, ésteres, glicosídeos e o ácido clorogênico como maior representante (Gavrilova et al. 2011; Rodriguez-Mateos et al. 2012).

A composição e o conteúdo dos compostos fenólicos em mirtilos variam amplamente, conforme o grupo que pertencem, as estações do ano e a localização geográfica. *Highbush* (*Vaccinium corymbosum* L.), *Lowbush* (*Vaccinium angustifolium*), *Rabbiteye* (*Vaccinium ashei*) e mirtilo nativo europeu (*Vaccinium myrtillus*), são qualitativamente muito similares (Rodriguez-Mateos et al. 2012), como pode ser visto em estudo realizado por Katsube et al. (2003), conforme Tabela 1. Já com relação as condições climáticas, no Brasil, há menor conteúdo de antocianinas em mirtilos da região sudeste, que apresenta temperaturas mais amenas e invernos menos rigorosos, quando comparados com resultados da literatura encontrados nos frutos dos Estados Unidos, Canadá e Europa, (Skrede et al. 2000; Souza et al. 2014), o que evidencia a importância da estação fria para a concentração de antocianinas em mirtilos.

Tabela 1: Conteúdo de Fenóis totais e Antocianinas em extrato de diferentes grupos de mirtilo.

Grupos de Mirtilos	Fenóis totais mg.g ⁻¹	Antocianinas mg.g ⁻¹
Lowbush	35,9 ± 0,4	12,1 ± 0,5
Highbush	26,4 ± 0,4	6,3 ± 0,4
Bilberry	55,1 ± 1,0	26,3 ± 1,5
Cowberry	35,4 ± 0,1	6,1 ± 0,4
Raspberry	39,0 ± 0,6	4,4 ± 0,2
Blackberry	42,5 ± 0,3	10,0 ± 0,6
Strawberry	22,5 ± 0,2	2,4 ± 0,2

Fonte: Katsube et al. (2003).

As antocianidinas são a estrutura básica das antocianinas (Figura 3) que apresentam frequentemente substituintes acilas, sendo mais comuns os derivados dos ácidos hidroxicinâmicos: ácido *ρ*-cumárico, ácido caféico e ácido ferúlico. Quando as antocianidinas são encontradas em sua forma glicosídica (com um radical ligado a um açúcar) elas formam as antocianinas (Ovando et al. 2009; Lima et al. 2011). O termo “antocianina”, derivado do grego (*anthos*, flores e *kyanos*, azul), foi criado por Marquart em 1835 para designar os pigmentos azuis das flores. Seu espectro de cor vai do vermelho ao azul, apresentando-se também como uma mistura de ambas as cores, resultando em tons de púrpura (Lima et al. 2011).

Estruturalmente, as antocianinas são diferenciadas das outras pela natureza, quantidade e posição dos grupos hidroxila e/ou metoxila. A porção glicosídica pode estar acilada geralmente na posição do carbono-6". Os açúcares substituintes, frequentemente encontrados são: glicose, galactose, ramnose, arabinose e xilose (Ovando et al. 2009). Esses sacarídeos estão localizados na maior parte dos casos nas posições carbono-3 e carbono-5 do núcleo flavílico (fenil-2-benzopirílio). A

glicosilação confere aumento da estabilidade e solubilidade das antocianinas quando comparadas com as respectivas antocianidinas (Skrede et al. 2000). Naturalmente, já foram citadas 23 antocianidinas e em torno de 500 tipos de antocianinas, das quais apenas seis são frequentemente encontradas na natureza e em alimentos: cianidina (50%), delphinidina, pelargonidina e peonidina (12%) e petunidina e malvidina (7%) (Figura 3) (Ovando et al. 2009; Rodriguez-Mateos et al. 2012).

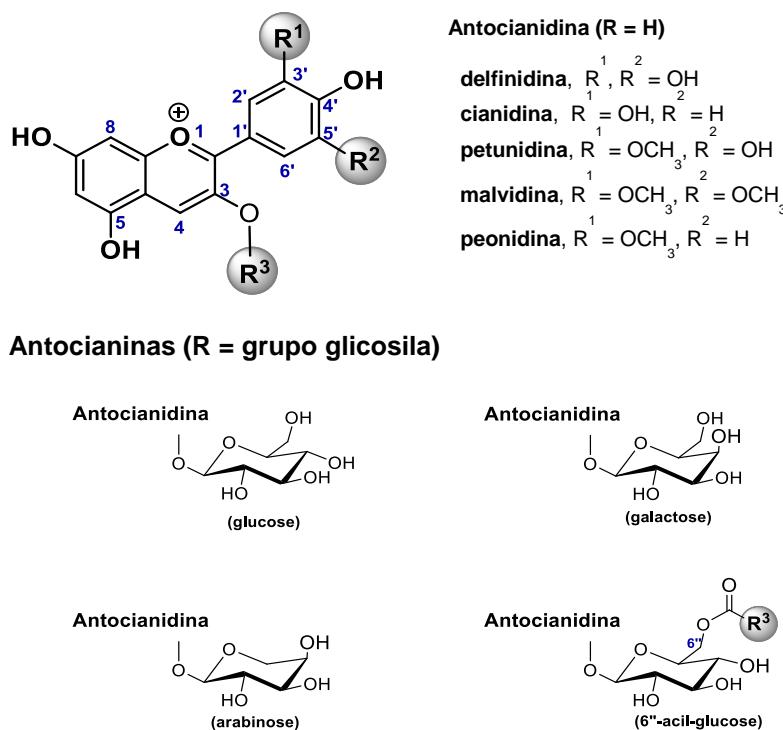


Figura 3. Estrutura básica das antocianidinas e as principais antocianinas encontradas na natureza.

Durante processos extractivos com espécies de *Vaccinium* utilizando-se metanol, verificou-se que o metanol 60% tem uma capacidade maior de extração destes compostos do que quando utilizado em outras concentrações, conforme Tabela 2. Dentre os fenóis totais presentes, a maior parte é constituída por ácido clorogênico. Os flavonóides estão intimamente associados à capacidade antioxidante dos extratos obtidos de produtos naturais. Sendo que no mirtilo esta atividade está relacionada à

presença de antocianinas e 30-35% destas antocianinas encontram-se na forma de cianidinas (Prior et al. 2001).

Tabela 2: Concentrações de compostos fenólicos e antocianinas em diferentes formas de extração.

Cultivar	Fração com 20% de Metanol:Água	Fração com 60% de Metanol:Água	Fração com 100% de Metanol
Fenóis totais (%)			
Lowbush	7,6 ± 3,0	47,7 ± 5,9	40,4 ± 9,2
Highbush	4,5 ± 0,9	49,0 ± 4,5	31,9 ± 7,7
Antocianinas (%)			
Lowbush	1,5 ± 1,5	94,0 ± 1,9	17,9 ± 4,7
Highbush	2,2 ± 0,5	92,1 ± 6,5	7,8 ± 2,8

As concentrações correspondem a Média ± Desvio Padrão para duas separações fracionadas. **Fonte:** Katsube et al. (2003).

Uma característica marcante das antocianinas está o fato de que em soluções aquosas, apresentam diferentes estruturas em função do pH. Normalmente, as antocianinas são estáveis em pHs entre 1,5 e 3,0. Em pH 1,0-2,0 a estrutura predominante corresponde ao cátion flavílico, conferindo a coloração vermelha. Para um meio com pH maior que 2,0 é observado um equilíbrio entre o cátion flavílico e uma estrutura conhecida como pseudobase carbinol (Março & Poppi 2008). Com aumento do pH, as antocianinas perdem a cor até se tornarem praticamente incolores em pH aproximadamente 7,0. Sendo assim, em valores de pH entre 6,0 e 7,0, predominam as bases quinoidais de cor azul e, pseudobase carbinol. Em pH acima de 8,0 forma-se a espécie cis-chalcona, com coloração menos intensa (Ovando et al. 2009). Em pH extremamente alcalino, observa-se o equilíbrio entre formas ionizadas de chalconas cis e trans, apresentando coloração amarela (Março & Poppi 2008) (Figura 4).

Os ésteres do ácido gálico e do hexahidrociclidifênico formam-se juntos às proantocianidinas, que são compostos incolores, existentes em quase todas as frutas (Belitz & Grosch 1997). Estes são importantes no sabor de muitas frutas e bebidas como mirtilos, bananas e nos vinhos. Todas as proantocianidinas produzem, quando aquecidas na presença de um ácido mineral, as antocianidinas que apresentam diversas colorações como visto anteriormente (Fennema 1997).

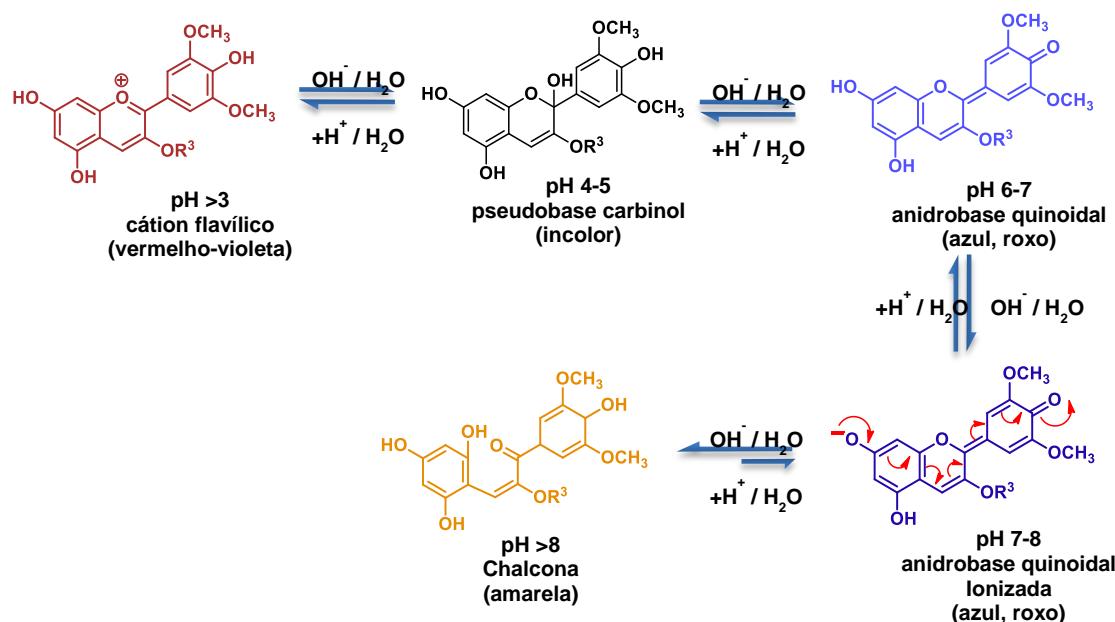


Figura 4: Esquema simplificado do equilíbrio químico das antocianidinas em relação ao pH.

Os flavonóis e 3-hidroxiflavonas são também componentes das espécies de *Vaccinium* spp. Normalmente, estes compostos apresentam-se como glicosídeos de quercitina, mirecetina e *kaempferol*. A isohamnetina (uma quercitina metoxilada) e siringetina (dimetóxi derivada da mericitina) são também identificadas como agliconas de flavonóis. No entanto, em geral, quercetina e campferol estão presentes em maior

quantidade e há ocorrência também de 3-glicosídeos e 3-glicuronóides (Manganaris et al. 2014).

Os taninos, substâncias fenólicas que também fazem parte da composição dos mirtilos, podem ser classificados como hidrossolúveis e não hidrolisáveis ou condensados (Manganaris et al. 2014). Os taninos hidrolisáveis são polímeros heterogêneos que contêm ácidos fenólicos (ácidos gálico, cafeico, elágico) e açúcares simples. Eles são menores, em peso molecular, que os taninos condensados e podem ser hidrolisados com mais facilidade, sendo somente necessária a adição de ácido (Taiz & Zeiger 2013). Os taninos não hidrolisáveis ou condensados são compostos formados pela polimerização de unidades de flavonóides, predominantemente catequina, que estão presentes em maior quantidade nos alimentos (Silva & Silva 1999; Taiz & Zeiger 2013).

2.3 Atividades biológicas do mirtilo

Estudos *in vitro* e *in vivo* sugerem que o consumo de mirtilo proporciona vários benefícios à saúde, incluindo melhora da função cognitiva, redução do risco cardiovascular (Faria et al. 2010; Kim et al. 2013; Lopera et al. 2013), atividade antioxidante (Pertuzatti et al. 2014), antitumoral (Yi et al. 2005; Yun et al. 2009), anti-inflamatório (DeFuria et al. 2009), hipoglicemiante (Roopchand et al. 2013), atuação na doença de Alzheimer (Kim et al. 2013) e modulação da obesidade e adiposidade (Meydani & Hasan 2010). Na América do Norte, alimentos ricos em antocianinas são amplamente utilizados na medicina popular (Faria et al. 2010).

Kim et al. (2013), em estudos realizados com frutos pequenos oriundos da Coréia como mirtilo, amora, morango, framboesa, verificaram que estes frutos contém

proporcionalmente mais antocianinas e compostos fenólicos do que os frutos grandes, sendo que estes compostos encontram-se dispostos de forma mais concentrada no tecido epidérmico do fruto. Desta forma, as cultivares de mirtilo da Coréia são boas fontes de antioxidantes naturais e contêm grandes quantidades de compostos polifenólicos e antocianinas. Dietas com mirtilos têm demonstrado significativa proteção contra radicais livres e estresse oxidativo em hemácias *in vivo* (Yousdim et al. 2000). Pesquisas já revelaram a relação do estresse oxidativo com inúmeras doenças e testes experimentais verificaram que os antioxidantes presentes em *Vaccinium* spp. diminuem os danos oxidativos. A ingestão de frutos, contendo antioxidantes naturais, têm demonstrado redução nos fatores de risco cardiovascular (Nyberg et al. 2013).

A capacidade antioxidant dos frutos está relacionada com uma diversidade de fatores incluindo fatores genéticos, espécies, cultivar, condições do local de cultivo, armazenamento e cuidados pós-colheita, processamento e maturação. A maturação das frutas é reportada como um fator que influencia no conteúdo de antocianinas, substâncias diretamente relacionadas à capacidade antioxidant. Ensaios realizados revelam que o pico no conteúdo de antocianinas ocorre no início do estágio de desenvolvimento (Manganaris et al. 2014). Em seu estudo, Youdim et al. (2000) verificaram as potenciais propriedades antioxidantas do mirtilo *in vitro* e *in vivo*, contra espécies reativas de oxigênio (ROS) utilizando como modelo as células vermelhas do sangue (hemácias) e ratos. Para desenvolvimento do ensaio, as hemácias foram incubadas com 0,5 mg.mL⁻¹ por 6 horas ou 0,05 mg.mL⁻¹ por 24 horas com antocianinas provenientes de extratos de mirtilo e *in vivo* deu-se a suplementação oral aos ratos com 100 mg.mL⁻¹ de antocianinas. Os resultados demonstraram que as antocianinas reduzem a suscetibilidade das hemácias quando expostas a substâncias reativas de oxigênio (ROS)

nos testes *in vitro*, e *in vivo* a suplementação com antocianinas gerou maior proteção, incluindo redução da susceptibilidade do soro a peroxidação lipídica e proteção contra a isquêmica hepática induzida pelo dano.

Estudos revelam que as cultivares produzidas no Brasil também demonstram potencial antioxidante. A atividade antioxidante de mirtilos obtidos de seis cultivares da espécie *Vaccinium ashei* Reade cultivados em Pelotas (RS) foi determinada a partir da habilidade dos componentes em sequestrar o radical DPPH• (2,2 difenil-1-1 picrilhidrazil). Foram avaliadas as diferenças na atividade antioxidante da casca, polpa e fruto inteiro, onde evidenciou-se que há uma atividade antioxidante muito maior na casca do que nas outras partes do fruto, conforme Tabela 3 (Pertuzatti et al. 2012). Em pesquisa realizada com extratos de morango, amora, cereja, framboesa e mirtilo obtidos nos estados brasileiros de Minas Gerais e São Paulo, verificou-se a atividade antioxidante usando os métodos ABTS, DPPH e Beta-caroteno, onde o mirtilo também apresentou importante capacidade antioxidante (Souza et al. 2014).

Tabela 3: Conteúdo de compostos fenólicos na casca, polpa e fruto inteiro de *Vaccinium ashei* Reade.

Cultivar	Casca	Polpa	Fruto inteiro
DPPH (30 minutos) - µmol TE/g de fruta fresca			
Woodard	2.456,7	211,8	811,6
Powderblue	5.223,9	694,0	1046,5
Bluebelle	4.908,4	210,8	720,6
Briteblue	1.028,6	185,1	707,3
Clímax	867,4	311,2	547,1
Delite	931,6	232,6	552,2

Fonte: Pertuzatti et al. (2012).

Em pesquisa realizada com extratos de morango, amora, cereja, framboesa e mirtilo obtidos nos estados brasileiros de Minas Gerais e São Paulo, verificou-se a atividade antioxidante usando os métodos ABTS, DPPH e Beta-caroteno, onde o mirtilo apresentou um conteúdo fenólico de 305,38 mgGAE em 100 g do fruto e capacidade oxidante de 5,88 $\mu\text{mol.g}^{-1}$ f.w. (ABTS), 7.775,45 g f.w. gDPPH^{-1} (DPPH) e 59,88 % de proteção (β -caroteno). Sendo identificado neste estudo importante capacidade antioxidante do mirtilo (Souza et al. 2014). Em outro estudo, foi avaliado o potencial do extrato de mirtilo sobre a proteção das artérias comprometidas pela hipertensão, aterosclerose e arteriosclerose, patologias que reduzem a flexibilidade das paredes das artérias contribuindo para diminuição da circulação sanguínea e formação de placas no interior dos vasos. Neste experimento, ratos com aortas comprometidas pela adição de óxido nítrico, foram expostos a extratos de mirtilo enriquecidos com antocianina. Os modelos experimentais exibiram relaxamento do endotélio comprometido. As antocianinas presentes em mirtilos agem como cardioprotetor pela manutenção da permeabilidade vascular, reduzindo a resposta inflamatória e a agregação plaquetária, e oferecem proteção cardiovascular superiores quando comparadas com outras drogas cardioprotetoras (Stone et al. 2007).

Também foi verificado o efeito dos extratos de mirtilo sobre adipócitos. Nestes estudos, a dieta de camundongos foi suplementada com 60% de calorias provenientes de gordura e formam adicionadas 2,9 mg.g^{-1} de antocianinas purificadas extraídas de mirtilos. Os camundongos diminuíram seu peso corporal e o conteúdo de tecido adiposo em comparação aos controles que foram alimentados com altas concentrações de gordura. Além disso, a administração de antocianinas purificadas de mirtilos também reduziu os níveis de triglicerídeos, colesterol e de leptina (Meydani & Hasan 2010).

Somado a isso, foram verificados os efeitos sobre o Diabetes tipo II, condição com incidência aumentada no mundo. Em um estudo realizado no Canadá verificou-se que os extratos de *V. angustifolium* possuem propriedades semelhantes à insulina, com melhoria da atividade insulino quando administrado $12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ de extrato etanólico de raiz, caule, folha, e frutas em tecidos periféricos e células beta do pâncreas. Os extratos da raiz, caule e folha melhoraram em 15 a 25% o transporte de glicose em linhagem de células mioblasticas esqueléticas (C2C12) testadas na presença e ausência de insulina depois de 20 horas de incubação (Martineau et al. 2006; Grace et al. 2009). Efeitos hipoglicemiantes também foram observados em pesquisa americana realizada por Grace et al. (2009), que comprovou que as antocianinas presentes em *Vaccinium angustifolium* têm capacidade para aliviar os sintomas de hiperglicemia em diabéticos. Houve maior atividade hipoglicemiante da fração enriquecida com antocianina em comparação ao extrato fenólico inicial.

Também foram identificados importantes efeitos citotóxicos e antitumorais em trabalhos desenvolvidos em diversos países com diferentes espécies de mirtilo. O extrato de mirtilo demonstrou ser eficaz em inibir o crescimento de células de leucemia humana HL60 e células de carcinoma do cólon humano HCT-116 *in vitro*. Este induziu a formação de corpos apoptóticos e fragmentação do DNA nucleossomal em células HL60. Os resultados indicam que o extrato inibe o crescimento das células HL60, através da indução da apoptose. Extratos etanólicos de mirtilo foram adicionados à cultura com meio de células de leucemia humana HL60 e incubadas durante 24 h. Verificou-se que 4 a 6 mg.mL^{-1} de extratos de bagas de mirtilo foram capazes de inibir o crescimento de células HL60, enquanto que para as células HCT-116 de carcinoma de

cólon humano foi necessária uma concentração menor, variando entre 2 a 4 mg.mL⁻¹ (Olssom et al. 2004).

Extrato de *Vaccinium corymbosum* (L.) obtido por sonicação em metanol acidificado com uma solução aquosa 0,1% de HCl, a fim de obter-se extração de grande quantidade de antocianinas, e posteriormente solubilizados em água destilada e diluídos em concentrações específicas de 25, 50, 100 e 200 µg.mL⁻¹ foi utilizado no tratamento das seguintes linhagens: CAL-27 e KB (células de câncer bucal), MCF-7 (células de câncer de mama), LNCaP (células de câncer de próstata) e HT-29 e HCT 116 (células de câncer de cólon). As células foram mantidas em contato com o extrato por 48 horas e posteriormente foi realizada leitura da viabilidade celular, por MTT, obtendo-se os resultados de IC50 conforme Tabela 4. No mesmo estudo foram verificados os efeitos pró-apoptóticos com a linhagem HT-29, de câncer de cólon, quando submetida a uma concentração de 200 µg.mL⁻¹ de extrato de mirtilo por 48 horas. Foi observado redução no número de células vivas devido a indução da apoptose, sugerindo-se uma associação do câncer e da proteína COX-2, pois as prostaglandinas são mediadores da inflamação e a inflamação crônica predispõe à carcinogênese (Seeram et al. 2006).

Tabela 4: Avaliação do potencial citotóxico do extrato de *Vaccinium corymbosum* (L.) em células tumorais.

Linhagem celular	IC50 µg.mL ⁻¹
CAL-27 (câncer bucal)	177,40 ± 0,07
KB (câncer bucal)	171,30 ± 0,03
MCF-7 (câncer de mama humano)	169,90 ± 0,04
LNCap (câncer de próstata)	36,45 ± 0,05
HT-29 (câncer de cólon)	89,96 ± 0,05
HT 116 (câncer de cólon)	90,00 ± 0,05

Fonte: Seeram et al. (2006).

Atualmente, a atividade citotóxica *in vitro* em cultura de células tumorais tem se tornado importante para a identificação de agentes anticâncer. A citotoxicidade celular pode ser avaliada por vários métodos. Dentre os métodos para se avaliar a viabilidade celular o ensaio MTT (brometo de 3-(4,5-dimetilazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) vem se destacando por tratar-se de um teste indireto, preciso e de execução rápida, baseado em uma reação colorimétrica. O sal MTT de coloração amarela, quando incubado com células metabolicamente ativas, entra na mitocôndria e é reduzido pela enzima succinato desidrogenase, produzindo cristais de formazan, com coloração azul escuro, assim a densidade óptica resultante do teste MTT é determinada em espectrofotômetro (Wang et al. 2010; Sylvester 2011). Existem alternativas ao MTT como o MTS (sal de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxipenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio) que apresenta basicamente o mesmo princípio, porém com menor toxicidade e maior solubilidade em água (Wang et al. 2010).

Ensaios utilizando *Vaccinium uliginosum* (L.) também foram descritos. Esta espécie de mirtilo comestível está geneticamente relacionada às espécies *Vaccinium myrtillus* (L.) e *Vaccinium corymbosum* (L.), muito comum na Rússia, Noruega e Norte da China. Liu et al. (2010) investigaram o efeito do extrato de *Vaccinium uliginosum* (L.) após 72 horas em contato com linhagem de células Caco-2 (adenocarcinoma colo-rectal), Hep-G2 (carcinoma hepatocelular) e 3T3-L1 (linhagem de células não malignas). A viabilidade celular foi verificada por ensaio MTT e estabeleceu-se o IC₅₀ para HepG2 em 0,563 mg.mL⁻¹, Caco-2 em 0,390 mg.mL⁻¹ e 0,214 mg.mL⁻¹ para células 3T3-L1. Identificou-se que o extrato consistia basicamente de antocianina cianidina-3. As células malignas testadas apresentaram diferenças na permeabilidade da membrana e danos muito maiores que os observados nas células não malignas.

Em outro estudo realizado por Faria et al. (2010), investigou-se as propriedades anticancerígenas de um extrato etanólico acidificado com alta concentração de antocianinas proveniente de mirtilos da espécie *Vaccinium myrtillus* contra linhagens celulares de câncer de mama (MDA-MB-231 e MCF-7). As linhagens foram submetidas a tratamento por 24 horas e a viabilidade celular foi verificada pelo ensaio MTS. Houve significativa redução da proliferação celular na concentração de 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, em ambas as linhagens. As antocianinas presentes no mirtilo demonstraram propriedades anticancerígenas, inibindo a proliferação de células cancerosas e, agindo como fatores celulares antiinvasivos e quimioprotetores.

Já na região nordeste da Romênia, foram realizadas investigações com extratos obtidos a partir de sete variedades de mirtilo da cultivar *Highbush (Bluegold, Nui, Darrow, Legacy, Nelson, Hannah's Choice e Toro)*. Para estas variedades, foram verificados os conteúdos de antocianinas, a atividade antioxidante e posteriormente, as variedades com melhor conteúdo de antocianinas foram testadas com linhagem B16-F10 de células de metástases de melanoma em concentrações que variam de 0 a 750 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24 h a 37°C e avaliadas por teste MTT. Além disso, a apoptose foi verificada utilizando-se ensaio com laranja de acridina/brometo de etídio com a concentração de tratamento celular de 600 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. A variedade Toro apresentou elevado conteúdo de antocianinas e, portanto foi testada nas células B16-F10. O tratamento foi realizado com 550, 600 e 650 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ por 24 h e resultou na diminuição da proliferação de células B16-F10 com 16,5%, 46,9% e 59,0%, respectivamente. Concentrações de 650 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ reduziram a proliferação celular em mais de 70% e identificou-se a inibição apoptótica. O valor de IC₅₀ foi calculado em 615,2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Bunea et al. 2013).

O ensaio de fluorescência com brometo de etídio e laranja acridina (BE/LA) é uma técnica comumente utilizada para avaliação da apoptose celular. Este método permite a visualização através de microscópio de fluorescência de modificações nucleares e a formação de corpos apoptóticos que é uma característica da apoptose (Kheirollahi et al. 2014). O laranja acridina consegue atravessar membranas celulares íntegras e ligar-se ao DNA, conferindo uma coloração esverdeada para a região do núcleo de células viáveis, além disso, também marca as células que se encontram na fase inicial de apoptose, de modo que são observadas manchas verdes nos núcleos das células, marcando a cromatina condensada. Já o brometo de etídio atravessa apenas membranas não íntegras e cora preferencialmente células com apoptose tardia/necrose, que são visualizadas em microscopia de fluorescência em uma cor laranja-avermelhada (Bunea et al. 2013).

2.3 Considerações sobre carcinogênese e morte celular

Por milênios, as causas mais comuns de morte foram a violência, os acidentes e as doenças infecciosas. Em 1900, as principais causas de morte nos Estados Unidos estavam associadas com quadros de pneumonia, gripe e tuberculose. Um século mais tarde, doenças cardíacas e o câncer ocupam o cenário de incidência para doenças crônicas (Brody 2014). O câncer acomete a humanidade há mais de três mil anos antes de Cristo, sendo detectada em múmias egípcias, mas somente entre 460 a 377 a.C. Hipócrates, o pai da medicina, descreveu e nominou a patologia como câncer, palavra que deriva do grego *karkinus* e que significa caranguejo (INCA 2011). O câncer é o nome geral dado a um conjunto complexo e heterogêneo de condições, que engloba mais de 100 doenças, que têm em comum o crescimento desordenado de células, que

tendem a invadir tecidos e órgãos vizinhos (Martin & Henry 2013; Brücher & Jamell 2014).

Os índices relativos aos casos de mortalidade relacionada ao câncer ainda assustam, em 2012, 15% das mortes no mundo foram devidas ao câncer. Atualmente, o índice global de câncer continua aumentando em grande parte por causa do envelhecimento e do crescimento da população mundial (Brody 2014; INCA 2014). Baseado em estimativas do GLOBOCAN 2008, dos 12,7 milhões de casos de câncer foram calculadas 7,6 milhões de mortes; destes, 56% dos casos e 64% das mortes aconteceram no mundo economicamente em desenvolvimento (Jemal et al. 2011).

Nas últimas décadas, o câncer ganhou uma dimensão maior, convertendo-se em um evidente problema de saúde pública mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que, no ano 2030, pode-se esperar 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes devido a patologia e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com a doença. No Brasil, as estimativas para o ano de 2014 serão válidas também para o ano de 2015 e apontam a ocorrência de aproximadamente 580.000 novos casos de câncer. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de pele não melanoma, próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de pele não melanoma, mama, colo do útero, cólon e reto e glândula tireóide para o sexo feminino (INCA 2014).

O câncer ocorre devido à exposição a agentes mutagênicos e carcinogênicos, oriundos de fatores ambientais, vírus, hábitos alimentares, fumo e estilo de vida, ou devido à predisposição genética. Os agentes mutagênicos e carcinogênicos danificam o DNA na fase de replicação celular, modificando o código genético de modo irreversível

(Dunn 2012). Vários agentes infecciosos são considerados causas de câncer em seres humanos. Os principais são a bactéria *Helicobacter pylori* (5,5% de todos os casos de câncer), o vírus papiloma humano (5,2%), os vírus da hepatite B e C (4,9%), vírus de *Epstein-Barr* (1%) e o vírus da imunodeficiência humana (HIV) em conjunto com o vírus do herpes humano tipo 8 (0,9%). Fatores genéticos também estão intimamente ligados à proliferação e desenvolvimento da doença, as formas mais comuns de câncer, que são o câncer de mama e cólon, são causados por mutações de genes de estabilidade (Parkin 2006).

Uma das principais características dos tumores é a diferenciação do crescimento celular. As células tumorais malignas apresentam desenvolvimento rápido, agressivo e incontrolável, formando outras novas células anormais (WHO 2013, Williams et al. 2013). Enquanto que os tumores em benignos ou malignos. Os tumores benignos ou neoplasias benignas apresentam crescimento lento, de forma organizada, com limites e bordas definidas, não apresentam metástase, mas podem comprimir tecidos e órgãos adjacente (WHO, 2013).

Até aproximadamente um século atrás, o crescimento do tumor era considerado como um desarranjo fundamental e os tumores foram classificados e descritos conforme suas taxas de crescimento: (1) lenta, (2) moderadamente rápida, (3) e rápida. Hoje, considera-se na carcinogênese as mutações que ocorrem nos genes inibidores de crescimento, os genes supressores de tumor que, por sua vez, dão origem a proliferação de células, invasão dos tecidos, e o risco de metástases (Lee et al. 2013). Alterações em três tipos de genes são responsáveis pela formação de tumores: oncogenes, genes supressores de tumores e estabilidade de genes. As células de mamíferos têm múltiplas formas de proteção contra os efeitos potencialmente letais das mutações genéticas que

levam ao câncer, e apenas quando vários genes são defeituosos é que um câncer invasivo se desenvolve (Vogelstein & Hinzler 2004).

Dessa forma, mutações em oncogenes e em genes supressores de tumores funcionam de forma semelhante no nível fisiológico: há aumento no número de células tumorais, através do estímulo da proliferação celular ou a inibição da morte celular ou parada do ciclo celular. O aumento pode ser causado pela ativação de genes que dirigem o ciclo celular, através da inibição de processos apoptóticos ou facilitando o fornecimento de nutrientes através do aumento da angiogênese. Uma terceira classe de genes do câncer, chamados genes de estabilidade, promove tumorigênese de uma forma completamente diferente quando sofre mutação. Esta categoria inclui o reparo por mal pareamento (MMR), reparo de excisão de nucleotídeos (NER) e reparação de excisão de bases (BER), genes responsáveis pela reparação de erros sutis cometidos durante a replicação do DNA normal ou induzidos por exposição aos agentes mutagênicos (Vogelstein & Hinzler 2004).

Como modelo de estudo de carcinogênese e mutagênese, frequentemente utilizam-se linhagens celulares como MCF-7 (mama), Hep-2 (laringe), PC03 (próstata), HeLa (cérvix), HT-29 (cólon), OVCAR03 (ovariana) que são derivadas da transformação de células de um tipo de carcinoma, especificamente (Formagio et al. 2013). Grande parte destes modelos celulares apresentam características semelhantes com proliferação rápida e ciclo celular de 18 a 24 horas, o que pode até influenciar para verificação de atividades citotóxicas similares entre as diversas linhagens celulares (Lima et al. 2005). A drogas testadas para possíveis atividades citotóxicas diante deste modelos celulares são mantidas em contato com as células por um período de tempo de

24 a 72 horas, sendo determinada a curva dose-efeito e posteriormente o parâmetro de inibição proposto (Seito et al. 2011).

A morte celular pode ocorrer por dois mecanismos majoritários: a apoptose e a necrose (Elmore 2007; Galluzzi et al. 2014). Em meados do século 19, Rudolf Virchow demonstrou que a necrose é uma forma de morte celular reconhecível (Linkermann & Green 2014), não sendo a apoptose a única forma geneticamente codificada de morte celular. A necrose é uma morte celular "accidental", pois geralmente ocorre como resultado de uma lesão traumática não intencional, podendo ser térmica, química ou anóxica. A célula incha e há rupturas celulares, liberando aleatoriamente conteúdos fragmentados em seus arredores (Liu et al. 2010). Já foi elucidado que a necrose é distinta da apoptose, em parte devido à crença de que a necrose não é um evento programado por vias moleculares. É claro agora, no entanto, que em alguns contextos, que a morte celular por necrose pode ser acionada por vias moleculares definidas (Linkermann & Green 2014).

Este processo foi reconhecido em 2005 por pesquisadores e foi denominado como necroptose indicando a necrose dependente da proteína quinase 3 (RIPK3) regulada de forma não apoptótica na presença de uma base genética ou da inibição farmacológica de caspases e identificada em um número crescente de patologias tais como lesão isquêmica no cérebro, coração e rins, doenças inflamatórias, sepses, distúrbios da retina e doenças neurodegenerativas (Galluzzi et al. 2014; Jouan-Lanhouet et al. 2014). No entanto, a identificação do processo de necroptose *in vivo* continua em condições experimentais, principalmente devido à ausência de marcadores específicos (Jouan-Lanhouet et al. 2014). Hoje, sabe-se que RIPK1 traduz sinais pró-necróticos por interações funcionais envolvidas com o homólogo RIPK3. A necrose é independente de

RIPK-1 (receptor de interação da proteína 1), mas dependente de RIPK-3. Durante a necrótose, RIPK3 fica ativado podendo ou não envolver RIPK1, adquirindo a capacidade do domínio quinase de linhagem mista (MLKL), uma pseudoquinase que se liga a ATP e que não é quimicamente ativa (Galluzzi et al. 2014).

Em contrapartida, um século depois do conhecimento do processo de necrose, uma outra forma de morte celular, a apoptose, foi definida. Este processo é conduzido por um conjunto de mecanismos moleculares que levam a morte celular programada (Linkermann & Green 2014). A apoptose, também designada morte celular programada (PCD–Programmed Cel Death) desempenha um papel fundamental no desenvolvimento e homeostase de organismos multicelulares. Defeitos na via apoptótica podem levar a várias doenças, tais como doenças neurodegenerativas, doenças auto-imune, AIDS e câncer (Schleich & Lavrik 2013). A morte apoptótica é caracterizada por encolhimento celular total, formação de corpos apoptóticos na membrana, condensação da cromatina e fragmentação do DNA (McHugh & Turina 2006).

A morte celular programada é regulada por duas vias: a extrínseca e a intrínseca. Na primeira há participação de receptores expressos na membrana plasmática da célula, chamados de receptores de morte (DR – Death Receptors) (Hail et al. 2006; McHugh & Turina 2006; Schleich & Lavrik 2013) que pertencem à superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), incluindo TNF, TNFR1, TRAMP, TRAIL e Faz. Nesta via, há uma associação de monômeros de diferentes receptores de morte na membrana plasmática que, ao se agruparem, promovem o recrutamento das proteínas adaptadoras capazes de activar a cascata das caspases. Já a apoptose pela via intrínseca ocorre na mitocôndria e diversos sinais atuam modulando a permeabilização da membrana mitocondrial externa. Danos no DNA são o estímulo principal para a apoptose mitocondrial, podendo ser

ativada por hipóxia, espécies reativas de oxigênio, irradiação ultravioleta ou gama, redução de fatores de crescimento e vários compostos citotóxicos, resultando na ativação de proteínas pró-apoptóticas (Martin & Henry, 2013).

Dando sequência ao entendimento do processo de morte apoptótica, verifica-se que tanto a via extrínseca quanto a intrínseca possuem um grupo independente de caspases iniciadoras que convergem sinais para o mesmo grupo de caspases efetoras com finalidade de executar eventos intracelulares que resultarão na morte celular programada (Zhang et al. 2004). Armazenado como zimogênios inativos, as caspases na via extrínseca, são primeiramente auto-ativadas, para consequentemente ativar o efetor de caspases por clivagem num segmento ligado a um resíduo de aspartato (Degterev et al. 2003; McHugh & Turina 2006). Esta caspase iniciadora pode ativar uma caspase efetora, tal como a caspase-3, fortalecendo a relação com a apoptose. A via mitocondrial, em contraste, depende da liberação de certos fatores pró-apoptóticos, como citocromo c, que precisa ligar-se ao fator de ativação de proteases apoptóticas (Apaf) e pro-caspase-9. Este complexo, conhecido como o apoptossomo, pode ativar a caspase-3. O citocromo c encontra-se, normalmente, no limite da membrana interna, no espaço intermembrana, sendo também importante na evolução da apoptose quando liberado da mitocôndria. Devido a existência desses diversos mecanismos para a apoptose, com um grande número de estimuladores e inibidores, na presença de um agente específico de bloqueio, o evento ainda pode ocorrer através da utilização de um outro mecanismo (McHugh & Turina 2006).

Além da infinidade de sinais de morte tanto nas vias intracelulares e extracelulares, a apoptose está sujeita a outros pontos de regulação dentro da cascata. Várias proteínas podem exercer os seus efeitos sobre as mitocôndrias e limitar a

propagação da apoptose mitocondrial. Um grupo de moléculas que desempenha este papel é da família de proteínas intracelulares que compreende tanto fatores antiapoptóticas, quanto pró-apoptóticos. O fator anti-apoptótico Bcl-2, insere-se em várias membranas celulares, incluindo o retículo endoplasmático, membrana nuclear, e a membrana externa da mitocôndria. A presença de Bcl-2 pode prevenir a apoptose. Os fatores pró-apoptóticos da família Bcl-2, tais como o Bax, são capazes de induzir a morte de células através da liberação de moléculas apoptóticas como citocromo c, possivelmente através de poros adicionais formados na membrana externa da mitocôndria (Vogelstein & Hinzler 2004).

Outra proteína pró-apoptótica é o gene supressor tumoral p53 que atua para integrar os múltiplos sinais de estresse para uma série de diferentes respostas anti-proliferativas (Fridman & Lowe 2003). Anteriormente conhecido majoritariamente por conduzir a parada do ciclo celular em resposta ao dano celular, o p53 agora é referenciado por seus inúmeros papéis na apoptose, podendo ativar a transcrição de genes pró-apoptóticos e reprimir genes anti-apoptóticos, também por induzir diretamente a apoptose através da formação de um complexo com as proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 e Bcl-xL. Este complexo permeabiliza a membrana mitocondrial externa, resultando na liberação de fatores pró-apoptóticos (McHugh and Turina 2006). O modo mais comum para interromper a via de p53 por meio de uma mutação de ponto que inativa a capacidade de se ligar especificamente à sua sequência de reconhecimento. Uma das mais curiosas descobertas da década de 1990 foi a de que praticamente todos os vírus que causam tumores em animais experimentais ou em seres humanos, que codificam proteínas, inativam a p53 (Vogelstein & Hinzler 2004).

Vê-se deste modo, que a apoptose e necrose compartilham vias de sinalização em comum. Existe um delicado equilíbrio entre os dois modos de morte, mas os resultados e as consequências para os organismos podem ser totalmente diferentes dependendo da via escolhida. Células em apoptose exibem alterações na morfologia, incluindo encolhimento da célula, a reestruturação da membrana plasmática, desorganização das organelas, condensação nuclear e fragmentação do DNA. As células são capazes de embalar-se em chamados “corpos apoptóticos”. Em contraste, as células necróticas geralmente incham até romperem e liberarem seu conteúdo para o ambiente (McHugh & Turina 2006). Deste modo, o desenvolvimento do câncer está associado ao rompimento do equilíbrio entre o crescimento e a morte celular: o balanço entre a taxa de proliferação e de apoptose determina a taxa de crescimento do tumor. Alterações entre esses fatores podem ser a chave para o crescimento descontrolado de tumores malignos e posteriormente, sua capacidade de invasão (Hajra & Liu 2004). Sendo que, a definição bioquímica para esta doença é a perda do controle dos mecanismos de proliferação, diferenciação e morte celular (Williams et al., 2013).

É de fundamental importância salientar que na prática clínica, há um potencial uso da morte celular programada na terapêutica do câncer ou em estudos para compreensão dos mecanismos de resistência à quimioterapia (Debatin 2004; Singh et al. 2014). Muitos agentes terapêuticos utilizados no tratamento de câncer, tais como a cisplatina, paclitaxel, adriamicina e isotiocianato, tem suas vias de ação na eliminação de as células tumorais através da indução da morte celular por apoptose (Hanahan & Weinberg 2011) A elucidação de alguns desses mecanismos moleculares da apoptose abririam perspectivas de modulação desses processos.

A ativação de vias apoptóticas é um mecanismo fundamental através do qual drogas citotóxicas matam células tumorais (Debatin 2004). Os defeitos na sinalização da apoptose contribuem para a resistência das drogas aos tumores. A ativação de sinalização de apoptose após o tratamento com drogas citotóxicas mostrou ativar a via intrínseca da apoptose. Além disso, a sinalização através da via extrínseca, contribui para a sensibilidade de células tumorais para o tratamento citotóxico. Percepções moleculares da regulação da apoptose e defeitos na sinalização apoptose em células tumorais irão fornecer novas abordagens para definir a sensibilidade ou resistência das células tumorais em direção terapia antitumoral e fornecer alvos para intervenções terapêuticas racionais para futuras estratégias terapêuticas (Kumar et al. 2014; Singh et al. 2014) .

Diante do exposto, cabe salientar a necessidade de mais estudos que envolvam a elucidação dos mecanismos envolvidos na formação de tumores, bem como a importância de um tratamento efetivo para os casos de câncer. Atualmente, uma porcentagem significativa de cânceres pode ser tratada, por cirurgia, radioterapia ou quimioterapia, especialmente se eles forem detectados precocemente (WHO 2013). Porém, o tratamento continua sendo um desafio médico, embora tenhamos tido avanços significativos nas últimas décadas. O tratamento clínico geralmente utiliza agentes antiproliferativos sistêmicos que destroem preferencialmente células em divisão (Bracke et al. 2008). Contudo, esses fármacos não são seletivos para células cancerosas e sua eficácia terapêutica fica limitada devido ao dano que podem causar às células e tecidos normais (Duarte 2010). Dessa forma, pesquisas envolvendo substâncias naturais, sejam elas, alimentos funcionais ou plantas, já utilizadas na medicina popular, devido a suas propriedades medicinais, podem colaborar para o entendimento do processo de

carcinogênese, esclarecendo as vias metabólicas empreendidas e o processo de parada do ciclo celular, permitindo a modulação dos sinais de apoptose (Nobili et al. 2009).

3. OBJETIVOS

Caracterizar quimicamente os extratos obtidos a partir da cultivar Misty do grupo *Southern Highbush* de mirtilo (híbrido interespecífico de *Vaccinium corymbosum* (L.) e avaliar sua atividade biológica em cultivo de células tumorais de carcinoma de laringe humano (Hep-2), adenocarcinoma de cérvix humano (HeLa), adenocarcinoma de cólon (HT-29) e não tumoral de fibroblasto de pulmão humano (MRC-5). Além disso, buscou-se verificar a influência do extrato sobre características morfológicas e indutoras de apoptose celular.

3.1 Objetivos específicos

- Caracterizar quimicamente os extratos hidroalcoólico de polpa, casca e fruto inteiro e extrato metanólico do fruto inteiro da cultivar Misty do grupo *Southern Highbush* de mirtilo por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) utilizando fonte de *electrospray*, acoplada a espectrômetro de massas (ESI-QTOF MS/MS) em modo negativo e positivo.
- Determinar a viabilidade celular frente ao efeito biológico dos extratos da cultivar Misty do grupo *Southern Highbush* de mirtilo em culturas de células tumorais e não tumoral através do ensaio de redução do MTT;
- Avaliar a expressão de marcadores envolvidos na apoptose celular com uso de coloração de brometo de etídio e laranja de acridina em cultura de células tumorais e não tumoral;
- Propor os prováveis mecanismos da atividade antitumoral dos extratos de da cultivar Misty do grupo *Southern Highbush* de mirtilo.

4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de dois artigos científicos. O primeiro (Capítulo I), intitulado **Cytotoxic activity on mammalian cells and chemical characterization of blueberry extracts (cv. Misty) cultivated in Brazil**, que será submetido a revista Phitochemistry e o segundo (Capítulo II), intitulado **Blueberry of cultivar Misty (Southern Highbush) cultivated in Brazil: cytotoxic activity and induce apoptosis on mammalian cells**, que será submetido a uma revista internacional.

4.1 Capítulo I

Cytotoxic activity on mammalian cells and chemical characterization of blueberry extracts (cv. Misty) cultivated in Brazil

Giovana Massarotto^a, Thiago Barcellos^b, Charlene Silvestrin Celi Garcia^a, Ana Paula Carneiro Brandalize^a, Sidnei Moura^b, Joséli Schwambach^b, João Antonio Pégas Henriques^a and Mariana Roesch-Ely^{a*}

^aLaboratory of Genomics, Proteomics and DNA Repair, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, RS, Brazil.

^b Laboratory of Biotechnology of Natural and Synthetic Products, Biotechnology Institute, University of Caxias do Sul, RS, Brazil.

*Corresponding author: Mariana Roesch-Ely, Laboratório de Genômica, Proteômica e Reparo de DNA, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas 1130, CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil. Phone: +55-54-3218-2100, Fax: +55-54-3218-2664. E-mail address: mrely@ucs.br.

ABSTRACT

Southern Highbush blueberry varieties cultivation is relatively recent in Brazil, but its production has been intensified given its good adaptability to the Southern Brazil climate. Blueberries are a rich source of phenolic compounds and contain significant levels of anthocyanins, flavonols, chlorogenic acids and procyanidins, which lead to different biological activities. Chemical identification of skin and whole hydroalcoholic blueberry extracts (ExtSB and ExtWB) revealed the presence of anthocyanins concentrated in the skin and others chemicals compounds as quercetin glycosides, proanthocyanins dimers, citric and chlorogenic acid in the pulp. Selectivity for tumor cell lines (Hep-2, HeLa, HT-29) using ExtSB and ExtWB extracts was observed through MTT assay after 24 hours of treatment when compared to non-tumor cells (MRC-5). Morphological changes and late stages of apoptotic and necrosis process were seen in HT-29 cell line after ExtWB treatment, compared to non-tumor cell line MRC-5. These results are in agreement with other studies that indicate the activity of compounds such as anthocyanins and other molecules found in Southern Highbush blueberry variety, attributed to promote beneficial effects on health that may respond as cytotoxic natural agent and contribute to cancer treatment.

Keywords: apoptosis; cancer; phenolics; Southern Highbush blueberry

1. Introduction

Southern Highbush blueberries are native of the Southern United States and have been commercially produced for many years in different regions around the world,

including Southern America and Europe (Dragovic-Uzelac et al. 2010; Bian et al. 2014). Most recently, the planted areas with blueberries in Brazil have systematically increased with focus on adaptation of these varieties to Brazilian climate (Pertuzatti et al. 2012). This group includes plants with low chilling requirements and with predominance of species *Vaccinium corymbosum* (L.). An important economic aspect of Brazilian blueberries is the harvest season, from December to late February. These months contrast from harvest seasons in the main consumer centers in the USA and European Union (Pertuzatti et al. 2014).

Blueberries are considered to be one of the richest sources of phenolic compounds, containing significant levels of anthocyanins, flavonols, chlorogenic acids derivatives and procyanidins leading to diverse biological activities. The predominant flavonoids found in this berries are anthocyanins, manly and flavonols (Buran et al., 2014). Molecules include, anthocyanidins, with its glycosylated form anthocyanins, flavonols (such as quercetin, kaempferol and myricetin), catechins (such as (+) catechin, (-) epicatechin and their oligomeric forms), benzoic and cinnamic acids (Giovanalli and Buratti 2009; Young et al., 2014).

There are many factors that influence the presence of phenolic compounds in blueberries. Results obtained from several studies suggest that the composition and content of phenolic compounds in blueberries are influenced by the cultivar, the growing season and location (Routray and Orsat 2014). According to Dragovic-Uzelac et al. (2010), variation in total phenolics, anthocyanins, flavonoids and fruit mass among different genotypes was much higher than the one observed between growing seasons, indicating the importance of further genetic investigations. Another interesting point reported is that some blueberries grown in tropical regions present higher

antioxidant contents than cultivars that are grown in temperate climates (Dastmalchi et al. 2011).

Dietary intake of natural phenolic products may contribute to reduce the rate of heart diseases, cancer mortality (Wang et al. 2014) and degenerative diseases (Manganaris et al. 2014). Studies with blueberry extracts are focused on the identification of phytochemicals, which are able to inhibit cancer cells growth. There are several reports evidencing the *in vitro* potential antiproliferative activity of fruit extracts against different cancer cell lines (Zhao et al. 2004; Skupien et al. 2006; Faria et al. 2010). Berry bioactives lead their anticancer effects through various complementary and overlapping mechanisms of action, including the induction of metabolizing enzymes, modulation of gene expression and their effects on cell proliferation, subcellular signaling pathways and apoptosis (Seeram 2008).

It is known that apoptosis is one of the major mechanisms of cancer suppression. Evidence shows that flavonoids participate in the process of cancer cell growth inhibition, through the induction of apoptosis (Bunea et al., 2013; López-Alarcon and Denicola 2013). However, the apoptosis-inducing properties of anthocyanins in cancer cells have not been well elucidated yet (Katsume et al., 2003). In addition, cancer chemotherapy is also associated with the occurrence of multidrug resistance (MDR), that is a major obstacle to successful cancer diseases treatment (Skupien et al. 2006; To 2013).

The aim of this study was to identify the compounds present in the skin, pulp and whole fruit of Southern Highbush blueberries cultivated in southern Brazil, and evaluate its cytotoxic activity against different tumor cell lines: human laryngeal

carcinoma (Hep-2), human cervix adenocarcinoma (HeLa) and human colorectal adenocarcinoma (HT-29). Cytotoxic effects were also tested in normal cell line: human lung fibroblast (MRC-5). The morphological alterations and induction of cell death exposure to skin, pulp and whole fruit hydroalcoholic extracts were also evaluated.

2. Results and discussion

2.1. Chemical characterization of blueberry anthocyanins

The common anthocyanidins already described in blueberries fruits are the cyanidin, delphinidin, malvidin, petunidin, and peodinin, which are mostly glicolysated by the hexoses glucose and galactose, as well as by the pentoses arabinose and xylose (Ma et al. 2013). The anthocyanins are the glycosylated form of the anthocyanidins, in which the glycolytic part is commonly bonded at the carbon-3 of the C-ring. However, xyloside anthocyanins are rarely reported (Nicoué et al. 2007, Gavrilova et al. 2011). In contrast, acylated derivatives are frequently described, although in very low concentrations. The common acyl groups are acetyl, malonyl, and coumaryl, and these molecules are commonly bonded at the carbon-6" of the glycosidic moiety (**Figure 1**).

Based on the positive charge present in the flavylium cation form of the anthocyanins, its molecular mass $[M]^+$ can be easily detected under ESI positive ionization mode analysis, allowing the characterization of the anthocyanins (Giusti et al. 1999). In addition, the MS/MS fragmentation analysis allows the identification of the anthocyanidins by its molecular mass $[M]^+$ via cleavage of carbon (C-3)-oxygen (glycolytic) bond. However, depending of the glycolytic moiety it cannot be fully

characterized due to exact masses, such as glucose and galactose. This identification issue can be overcome by elution order of the anthocyanins already established for reversed-phase columns such as C18 and C8 (Tian et al. 2005, Wu and Prior 2005). As extensively reported, the monoglycosylated anthocyanins are eluted first as galactoside, followed by glucoside and arabinoside derivative. Acylated anthocyanins eluted after nonacylated derivatives.

Following this elution rule, it was identified the anthocyanins by HPLC analysis employing the typical absorption (λ_{max}) at 520 nm as presented in **Figure 2**. In total, 14 peaks were assigned: the first two peaks were assigned as delphinidin-3-*O*-galactoside (**Table 1, peak 1**) and delphinidin-3-*O*-glucoside (**Table 1, peak 2**) according to the elution order. Both peaks are associated to molecular ions $[\text{M}]^+$ at *m/z* 465.1012 and 465.1018, respectively, which indicated that both are isomers. The MS^2 fragment ions $[\text{M} - \text{pyranosyl group}]^+$ at *m/z* 303.0495 and 303.0492 confirm delphinidin as the anthocyanidin. The **peak 3** reveals two anthocyanins, delphinidin-3-*O*-arabinoside with *m/z* at 435.0922 $[\text{M}]^+$ and fragment ion at *m/z* 303.0492 $[\text{M} - \text{arabinosyl group}]^+$ (**peak 3A**) and the first eluted glycosylated cyaniding, the cyanidin-3-*O*-galactoside with *m/z* at 449.1078 $[\text{M}]^+$ and MS^2 fragment at *m/z* 287.0552 $[\text{M} - \text{galactosyl group}]^+$ (**peak 3B**). Although the co-eluted peaks showed as a simple peak at chromatogram profile, it is possible to establish the elution order by appearance order of the mass signals.

In the co-eluted **peak 4**, we identified the petunidin-3-*O*-galactoside with an *m/z* of 479.1169 $[\text{M}]^+$ and a MS^2 fragment ion at *m/z* 317.0648 $[\text{M} - \text{galactosyl group}]^+$ (**peak 4A**) along with cyanidin-3-*O*-glucoside (*m/z* at 449.1072 $[\text{M}]^+$ and MS^2 *m/z* at 287.0547 $[\text{M} - \text{glucosyl group}]^+$) (**peak 4B**). **Peak 5** represents the anthocyanins petunidin-3-*O*-glucoside with *m/z* of 479.1168 $[\text{M}]^+$ and cyanidin-3-*O*-arabinoside with

m/z of 419.0981. **Peak 6** reveals the petudidin-3-*O*-arabinoside (*m/z* at 449.1071 [M]⁺) and the only glucoside representative of peonidin. The *m/z* of 463.1224 [M]⁺ indicates a pyranosyl group, which might be a galactosyl or a glucosyl group in the anthocyanin structure. Herein, we report this anthocyanin as peonidin-3-*O*-pyranoside. The **peaks 7, 8 and 9** were assigned as malvidin-3-*O*-glycosides, which MS² fragment has *m/z* of 331.08 [M – glucosyl group]⁺, being the **peak 7** associated to malvidin-3-*O*-galactoside (*m/z* at 493.1335 [M]⁺), **peak 8** to malvidin-3-*O*-glucoside (*m/z* at 493.1337 [M]⁺) and **peak 9** to malvidin-3-*O*-arabinoside (*m/z* at 463.1221 [M]⁺).

Peaks 10 to 14 reveal the less polar anthocyanins present in the sample evaluated in this study. **Peak 10** showed a molecular ion with an *m/z* of 507.1127 [M]⁺ and fragment ion at *m/z* 303.0488, which tentatively indicate delphinidin-3-*O*-(6'-acetyl) hexoside. In the **peak 11** an *m/z* of 463.1228 and a fragment ion at *m/z* 331.0805 indicates malvidin-3-*O*-xyloside. The molecular ion [M]⁺ with *m/z* at 465.1023 and a fragment ion with *m/z* 303.0491 disclosed at the **peak 12** was associated with an isomeric form of the delphinidin-3-*O*-hexoside. The **peak 13** shows the acylated form of petunidin- and malvidin-3-*O*-hexosides. The first was assigned as petunidin-3-*O*-hexoside with *m/z* at 521.1276 [M]⁺ and 317.0644 [M - (6"-acetyl)hexoside group]⁺ and the malvidin derivative was indicated as malvidin-3-*O*-(6"-acetyl)galactoside with *m/z* at 535.1431 [M]⁺ and fragment ion at *m/z* 331.0802 [M - (6"-acetyl)galactoside group]⁺. At the **peak 14**, the second acylated form of the malvidin was tentatively assigned as malvidin-3-*O*-(6"-acetyl)glucoside (**peak 14A**) with the same fragmentation pattern of the malvidin at **peak 13B**. Peonidin-3-*O*-(6-acetyl)hexoside was also assigned (**peak 14B**) due to the *m/z* at 505.1327 [M]⁺ and fragment ion with *m/z* at 301.0693.

The third anthocyanidin detected at **peak 14** (**peak 14C**) was tentatively assigned as petunidin-3-*O*-(6-coumaroyl)hexoside due to the accurate mass obtained with an *m/z* at 625.1529 [M]⁺ given an experimental error of -3,7 ppm. However, the rutinoside derivative could also been assigned duo to the approximately monoisotopic mass, 625.1552 u and 625.1764 u, respectively, and its occurrence in blueberry samples.

The deglycosylated forms of the anthocyanins were not detected using the extractions conditions applied in this study. Moreover, only monoglycosylated anthocyaninins are present according to the mass spectra data.

2.2 Chemical Characterization of flavonols and hydrocinnamic acids

Besides anthocyanins, blueberries are a good source of vitamin C, flavonols, procyanidins and hydroxycinnamic acids such as chlorogenic acid and its derivatives. These compounds are better detected under negative mode in ESI ionization technique and appropriated absorbance under HPLC UV-Vis analysis.

Citric acid (**peak 1**), present in the pulp fraction, was easily detected by its molecular ions [M-H]⁻ and [2M-H]⁻ at *m/z* 191.0178 and 383.0439, respectively. The **peaks 2, 4 and 7** share the same molecular ions [M-H]⁻ at *m/z* 353.08 and [2M-H]⁻ at *m/z* 707.17, including the same MS2 fragment ion [M-H]⁻ at *m/z* 191.05, which indicates thee chlorogenic acid and its isomers. Isomers were detected in the analyzed samples (**peaks 2, 4 and 7**). Quercetin glycosides were the dominant flavonoids detected in the samples. The characteristic MS² fragment [M-H]⁻ at *m/z* 301.03 in negative mode proves its identity (peaks 3, 8, 10 and 11). Among the galactosyl (**peak 3**), glucosyl (**peak 8**) and arabinosyl (**peak 10**) derivatives, an acylated version was also tentatively pointed as quercetin-3-*O*-(6"-acetyl)hexoside (**peak 11**). In addition, the glycosylated flavonoids

laricitrin-3-*O*-hexoside (**peak 9**) and syringetin-3-*O*-hexoside (**peak 12**) were also detected in the samples (**Table 2**).

Two proanthocyanins dimers with *m/z* at 577.13 [M-H]⁻ were assigned due to its fragmentation patterns, given mainly the fragment ion [M-H]⁻ at *m/z* 425, which is a result of a retro-Diels Alder scission (Callemien and Collin 2008).

2.3. Cytotoxicity assay

For all tumor cell lines analyzed, cell viability was determined by the tetrazolium salt method using the MTT technique. Initially, tumor lines HeLa, Hep-2 and HT-29, and non-tumor line MRC-5, were treated with skin, pulp and whole Southern Highbush blueberry extract for 24 h at a range of 0.005 to 2.5 mg mL⁻¹.

After 24 hours ExtSB, ExtPB and ExtWB treatment, 50% inhibitory concentration varied according to cell type and extract used. In tumor lines, HT-29 cells treated with ExtWB revealed the lower IC₅₀, 0.474±0.010 mg mL⁻¹ and treatment with ExtSB showed 0.591±0.007 mg.mL⁻¹, whereas Hep-2 cells presented the highest IC₅₀, 0.956±0.008 mg mL⁻¹ to skin extract and 0.880±0.003 mg mL⁻¹ to whole extract. The pulp extracts showed very high IC₅₀ for all cell lines (**Figura 3**). Non-tumor lines revealed IC₅₀ values above 5 mg mL⁻¹ (**Table 3**), indicating a selective cytotoxic activity.

Studies of extracts of different species of blueberry reinforce the results obtained with the ethanol extracts of blueberry variety Southern Highbush here investigated. The inhibitory activity of tumor metastatic melanoma cell line (B16-F10) in contact with methanol extracts of seven Highbush blueberry cultivars in Romania, was verified.

Anthocyanins, delphinidin, petunidin and malvidin were identified by HPLC-DAD and HPLC-ESI-MS. Treatment resulted in an IC₅₀ at 615.2 µg mL⁻¹, obtained from dose-response curve, in contact with the line B16-F10 in 24 h (Bunea et al. 2013).

Important results related to antitumor activity of anthocyanins were reported by Yun et al. (2009). Delphinidin (> 98% pure) isolated from fruits and vegetables was tested in HCT116 cells (human colon cancer) treated for 48 hours, at 37°C in a humidified chamber. The cell viability was determined by MTT assay, showing a IC₅₀ of 110 µM. Delphinidin treatment also resulted in 24%, 35% and 38% apoptotic index after 120 µM, 180 µM and 240 µM treatment. Delphinidin is the most frequent compounds of anthocyanins in fruits and vegetables showing potent antioxidant and anti-inflammatory activities, with important therapeutic effects against colon cancer cells (Afaq et al. 2007).

Inhibition of tumor cell survival with administration of fractions of anthocyanins was also observed by Rugina et al. (2012), with cytotoxic activity of chokeberry extracts on HeLa tumor cell line. Fractions containing only cyanidin glycosides (67.1% cyanidin-3-galactoside; 2.6% cyanidin 3-glucoside; 24.3% cyanidin-3-arabinoside and 5.8% cyanidin 3-xyloside) were tested in HeLa. The influence of cyanidin glycosides on survival was evaluated through mitochondrial succinate dehydrogenase activity. The cyanidin fraction inhibited 40% of HeLa cells survival of when administered with 200 µg mL⁻¹ of extract for 48 h.

Despite the importance of anthocyanin, the inhibitory effect on tumor cell lines of extracts derived from blueberry should not be exclusively attributed to its anthocyanin content. Olsson et al. (2004) observed that the fraction of the extract

containing only anthocyanins inhibits proliferation of HT-29 (colon cancer cells) and MCF-7 (breast cancer cells) cells less than cells treated with the total extract. Therefore, other substances presented in these extracts should be considered as active in inhibiting cell growth.

Faria et al. (2010) tested the ethanolic extract of *Vaccinium myrtillus* in breast cancer cell line (MDA-MB-231). A concentration of $250 \mu\text{g.mL}^{-1}$ extract was able to inhibit its the growth by 65% after 24 hours of treatment. Another study, also evaluated the effect of ethanol extract of *Vaccinium myrtillus*, but in MCF7 breast cancer cells, and obtained a percentage of inhibition of cell proliferation of only 11% when administered $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ of the extract and 66% at $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Nguyen et al. 2010). Similar effects were observed in human promyelocytic leukemia cells (HL60) treated with methanolic extract of blueberry for 72 hours, showing an IC_{50} of $240 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Spukien et al. 2006).

The results here presented, highlights a potential cytotoxic effects in the extracts of the whole fruit compared to extracts taken from the skin and pulp exclusively. It is possible that molecules such as flavonoids, vitamin C, procyanidins, chlorogenic and hydroxycinnamic acids, and other compounds present in the pulp fruit, synergistically potentiate the cytotoxic effects observed. Thus, many compounds present in plants have been reported for their inhibitory effects on the proliferation of cancer cells and found to be likely to contribute to cellular metabolism (Olsson et al. 2004).

2.4. Morphological examination of cancer cells and apoptosis analysis

Given the increased susceptibility of HT-29 to whole Southern Highbush blueberry extract, this line was selected for further morphological analysis with giemsa

and induction of apoptosis through AO/EB assay. MRC-5, a non-tumor cell line was also used as control. Substantial morphological changes in HT-29 cells at IC₅₀ (0.474 mg.mL⁻¹) were observed after 24h treatment with whole Southern Highbush blueberry extract, when compared to MRC-5.

AO/EB staining assessed the apoptotic potential after extract treatment. Tumor cell line HT-29 was treated in its IC₅₀ with ExtWB at 0.474 mg mL⁻¹ for 24 h and the non-tumor cell was treated with ExtWB at 5.00 mg mL⁻¹ at the same time. Percentages of early apoptosis, late apoptosis and necrosis are represented in **Figure 4**. The analysis showed that both tumor and non-tumor cells treated with blueberry extract revealed a more aggressive cell death pattern when compared with their untreated control. At the same time, significantly higher percentages of cell viability as well as lower percentages of early apoptosis and necrosis events were observed for non-tumor cell MRC-5 when compared to the tumor line HT-29.

It is well known that most cytotoxic anticancer agents induce apoptosis (Hanahan and Weinberg 2011). Apoptosis is an active, strictly regulated, and energy-dependent cell death process. In mammalian cells, apoptosis is regulated via two different pathways, the extrinsic and intrinsic pathways. The activation of caspase family proteins triggered by these two signaling pathways results in a series of cellular substrate excision and morphological cell changes (He et al. 2014).

The apoptotic effects of each berry extract was evaluated on the HT-29 colon cancer cell line to ascertain whether the observed reduction in viable cell number was due to the induction of apoptosis (**Figure 5**). Nuclear changes can be observed between

normal and apoptotic cells. Here, AO/ EB staining revealed apoptotic nuclei, (yellow-orange staining) and apoptotic bodies (red staining).

Katsume et al. (2003) reported apoptosis in cell line HCT116 (human colon carcinoma) and HL60 (human leukemia cells) after treatment with *Vaccinium myrtillus*. The presence of apoptotic bodies and nuclear fragmentation was observed in HL60 cells after 6 h of treatment with a concentration of 4 mg mL⁻¹ and fragmentation of nucleosomal DNA after 24 h of treatment. On the other hand, after 48 hours of treatment they observed only fragmented nucleic and a much smaller proportion of apoptotic cells that could be visualized only in the HL60 cell line.

Yi et al (2005) examined the antiproliferative activity and induction of apoptosis of blueberry extracts against two lines of colon cancer cells: HT-29 and Caco-2. The presence of DNA fragmentation was observed in HT-29 at a concentration of approximately 40 µg.mL⁻¹ and Caco-2 at 80 µg.mL⁻¹ when used anthocyanin fraction, which indicate induction of apoptosis that could be linked to increased expression of caspase-9 and cytochrome (Chuan et al. 2014). Seeram et al. (2006) found that the HT-29 cell line showed increased levels of apoptosis compared to the control group when treated with 200 µg.mL⁻¹ of extract of blueberry for 48 hours.

Thus, the results here presented reinforce that ExtWB extract very likely participate in the induction of cell death through the apoptotic activation. Recently, blueberry polyphenolic acids were able to repress breast cancer cells, and inhibit proliferation of colon cell lines, through caspase-9 and caspase-3 pathways (He et al. 2014).

3. Conclusions

In summary, we evaluated the major bioactive chemical constituents present in the Brazilian Southern Highbush blueberry hydroalcoholic extracts. The anthocyanins along with others polyphenolic compounds, identified for the first time in Southern Brazilian blueberries, present selective activity against tumor cell lines. These extracts are candidates to promote beneficial effects on health and may respond as cytotoxic natural agent, contributing in future to cancer therapy. These findings evoke additional studies to clarify the relationship of compounds here identified and the molecular mechanisms involved in its antitumor activity. It is essential, however, to identify bioactive molecules in different extracts, isolate compounds and determine whether the cytotoxic activity enhances with the isolated molecules or it is a matter of synergistic activity between compounds

4. Experimental

4.1. Southern Highbush blueberry sample

Ripened samples of Southern Highbush blueberry were collected in November 2012, in Vacaria city, situated in the Rio Grande do Sul State, Southern Brazil (Lat. 28°30'44"S by Lon. 50°56'02"W). The blueberries were stored at University of Caxias do Sul (UCS) for subsequent experiment analysis. Initially, each skin was removed with tweezers. Skin, pulp and whole fruits were stored in amber bottles and immediately frozen in an ultra-freezer at -80 °C.

4.2. Preparation of Southern Highbush blueberries extracts

Samples of skin, pulp and whole blueberry were grounded in liquid nitrogen to a powder form. To obtain the Southern Highbush blueberry hydroalcoholic extracts, 10 g of the powder sample, pulp or whole fruit, was mixed with 100 mL of 80% (v/v) EtOH-H₂O solution, through maceration process at room temperature for seven days in an amber bottle, under controlled shaking conditions. The extract was filtered and the solution evaporated to dryness. Three different types of hydroalcoholic extracts were produced: skin Southern Highbush blueberry extract (ExtSB), pulp Southern Highbush blueberry extract (ExtPB), and whole Highbush blueberry extract (ExtWB). All extracts were kept frozen at -20 °C for further experiments. The dry material was resuspended in 50% (v/v) EtOH-H₂O at different concentrations and aliquots were ultrafiltered through a 0.22 µm polyethersulfone membrane (TPP, Techno Plastic Products, Switzerland).

4.3. Chemical characterization

4.3.1 HPLC-MS analysis of blueberry fruits

The chromatography separation and subsequent HRMS analysis were accomplished on a Shimadzu Prominence UFC system equipped with two isocratics pumps (LC-20AD), a UV-Visible detector (SPD-20AD) and an Agilent Zorbax® SB-C8 column (5 µm, 150 x 4.6 mm) coupled to a Bruker Daltonics micrOTOF-Q II instrument in positive or negative mode. The mobile phase was constituted of 1.0% aqueous formic acid (phase A) and acetonitrile (phase B) using a gradient elution of 5% B for 2 min; 5 – 10% of B from 2 to 12 min; 10% of B for 8 min; 10 – 20% of B from 20 to 30 min; 20% of B for 10 min; 20 – 50% of B from 40 to 50 min; 50% of B for 5 min; 50 – 95% of B from 55 to 65 min; 95% of B for 5 min.; 95 - 5% of B from 70 to 75 min; 5% of B for 5 min. The analyses were carried out at 23 °C with a flow rate of

1.0 mL min⁻¹ and a sample volume injection of 10 µL. The chromatograms were monitored at 520, 360, and 320 nm for anthocyanins, flavonols and hydroxycinnamic acid derivatives respectively.

For the chemical characterization of the blueberry extractions via high-resolution electrospray ionization mass spectrometry (ESI-QTOF MS/MS), a low pressure Micro-Splitter Valves (Upchurch Scientific®) was set up after the LC-system and adjusted to a split flow of 0.2 mL min⁻¹. The data were collected in the m/z range of 50–1200 at the speed of two scans per second, providing resolution of 50.000 (FWHM) at m/z 200. The follow instrument parameters were applied: capillary and cone voltages were set to +3500 V and +40 V, respectively, with a desolvation temperature of 180 °C. MS/MS experiments with 10-40 eV collision energies were optimized for each analyte to facilitate the molecular identifications. For data acquisition and processing, Compass 1.3 for micrOTOF-Q II software (Bruker daltonics, USA) was used. The detected ions were identified by the comparison of their MS/MS fragmentation patterns with previously published data.

4.4 Cell culture

Tumor cell lines Hep-2 (human larynx carcinoma), HeLa (human cervical adenocarcinoma), HT-29 (human colon cancer) and non-tumor cell line MRC-5 (human lung fibroblast) were purchased from American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA. Cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) supplemented with 1% penicillin-streptomycin and 10% fetal bovine serum and maintained in a humidified atmosphere at 37 °C, under 5% CO₂ and 95% air. For the assessment of the cytotoxic activity, cells were seeded in 96-well flat-bottom

microplates at a density of approximately 1×10^5 cells per well in 10% fetal bovine serum. After cell attachment, serial dilutions in culture medium of ExtSB, ExtPB and ExtWB were prepared and the cells were incubated for 24 h.

4.5. Cytotoxic assay

4.5.1. MTT assay

Cell viability was determined by the tetrazolium salt method using MTT. Briefly, 1×10^5 cells/well were cultured in 96-well plates and incubated at 37 °C under 5% CO₂ for 24 hours with skin, pulp and whole Southern Highbush blueberry extracts, dissolved in ethanol 50% at increasing concentrations (0.005 to 1.00 mg mL⁻¹ for ExtSB and ExtWB, and 0.05 to 2.50 mg mL⁻¹ for ExtPB). The medium was removed and 1.0 mg mL⁻¹ of MTT dye in serum-free medium was added to the wells. Plates were incubated at 37 °C for 2 h in humidified 5% CO₂ atmosphere. After, the MTT solution was removed and a formazan violet product was obtained. This product was dissolved in 100 µL of dimethyl sulfoxide (DMSO), and absorption was determined at 570 nm (Spectra Max190, Molecular Devices, USA). At least three independent experiments were performed for each experimental extract and cell line, and IC₅₀ values were determined using equation developed by Monks et al. (1991). Negative controls were treated with the same amounts of hydroalcoholic solvent (residual amount ethanol = 3% on cells) incubated at 37 °C in 5% CO₂ for 24 h.

4.5.2 Cristal Violet Stain

HT-29 and MRC-5 cell lines were seeded in 96 well plates (1×10^5 cell per well) with supplemented fetal bovine serum media. After 24 hours, HT-29 cells were treated

with concentrations of ExtWB, at its IC₅₀, obtained in the cytotoxic assay. MRC-5 cells were treated with 5.00 mg mL⁻¹ of ExtWB, which was the maximum concentration used in the cytotoxic assay, followed by extract incubation at 37 °C, in 5% CO₂, for 24 hours. The cells were then fixed with methanol for five minutes and stained with 1% crystal violet solution for 10 minutes. The plate was washed with water and the cells were observed in microscope, with 200X magnification (BX43, Olympus).

4.5.3 Acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) stain

To visualize cellular changes that are characteristics of apoptosis and necrosis, the cells was stained with AO/EB and visualized under a fluorescence microscope. Two hundred cells were counted in triplicate in different fields, and apoptosis and necrosis percentage was calculated. Briefly, HT-29 and MRC5 cells were seeded (1x10⁵ cells per well) in six well plates and incubated for 24 h. The HT-29 cells were treated with its IC₅₀ concentration of ExtWB, obtained in the cytotoxic assay. MRC-5 cells were treated with 5.00 mg mL⁻¹ of ExtWB, which corresponds to the maximum concentration used in the cytotoxic assay, followed by extract incubation at 37 °C, in 5% CO₂, for 24 hours. After treatment, cells were detached with trypsin and washed twice with phosphate buffer saline (PBS). Twenty microliters of cells were placed on a glass slide with 2 µL of AO (100 µg mL⁻¹) and 2 µL EB (100 µg mL⁻¹). The cells were immediately visualized under a fluorescence microscope (BX43, Olympus) with 200X magnification.

4.6. Statistical analysis

Results were expressed as mean ± standard deviation obtained from three independent experiments. Statistical differences observed between groups for

cytotoxicity assay were evaluated using independent t-test and oneway analysis of variance (ANOVA), with post hoc test for multiple comparisons (Tukey). Independent t-test was also used to compare the differences for apoptotic and necrotic cells between treated and untreated control, as well as to compare the differences between treated tumoral and non-tumoral cell lines. Significance was accepted at p lower than 0.05 using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 20.0) for Windows.

Acknowledgments

We thank the Biotechnology Institute of the University of Caxias do Sul, CNPq and CAPES.

Figures and Tables

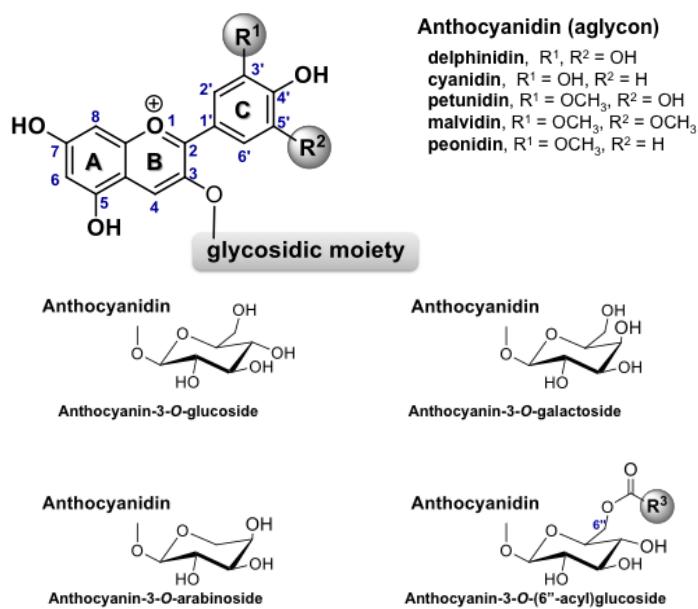


Fig. 1. Anthocyanins commonly found in blueberries.

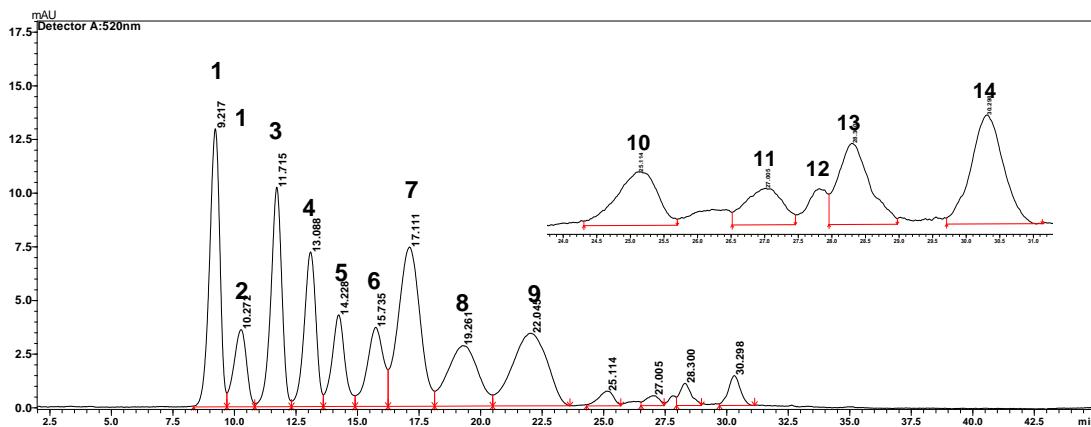


Fig. 2. Chromatogram profile of the anthocyanins present in blueberries collected in Southern Brazil and expansion of the peaks 10 to 15 (520 nm). Peak numbers correspond to those indicated in Table 1.

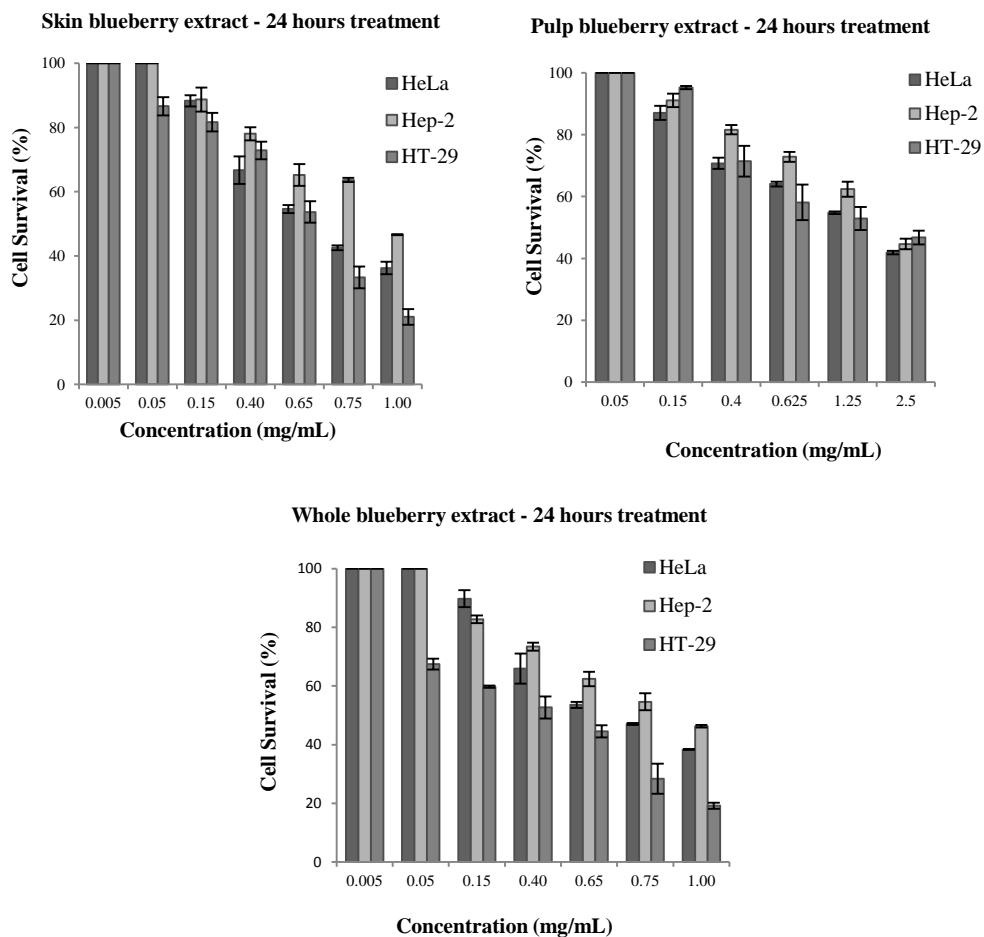


Fig. 3. Cell Survival (%) after 24 h treatment with ExtSB, ExtWB and ExtPB (mg.mL^{-1}). The cells were treated with 0.005, 0.05, 0.15, 0.40, 0.65, 0.75, 1.00 mg.mL^{-1} of ExtWB and ExtSB, and 0.05, 0.15, 0.4, 0.625, 1.25 and 2.5 mg.mL^{-1} of ExtPB. Cell viability was assessed by MTT assay. Each bar represents the average percentage of cell survival \pm SD relative.

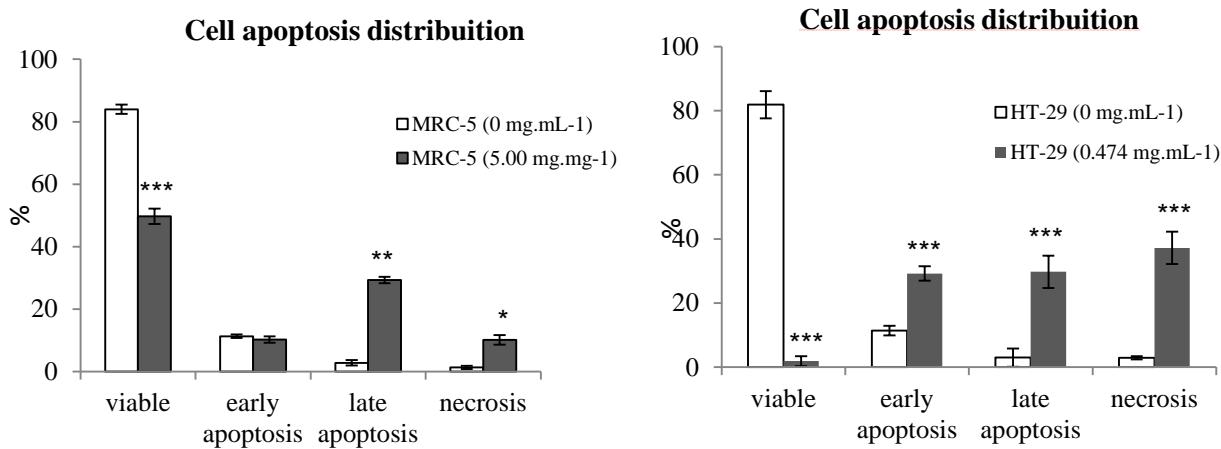


Fig. 4. Percent of cells viably, in early apoptosis, late apoptosis and necrosis with AO/EB assay in MRC-5 (non-tumor cell) and HT-29 (tumor cell) treated and non-treated with ExtWB. Statistical differences between treated with IC50 and their untreated control, *p<0,01, **p<0,001 and ***p<0,0001.

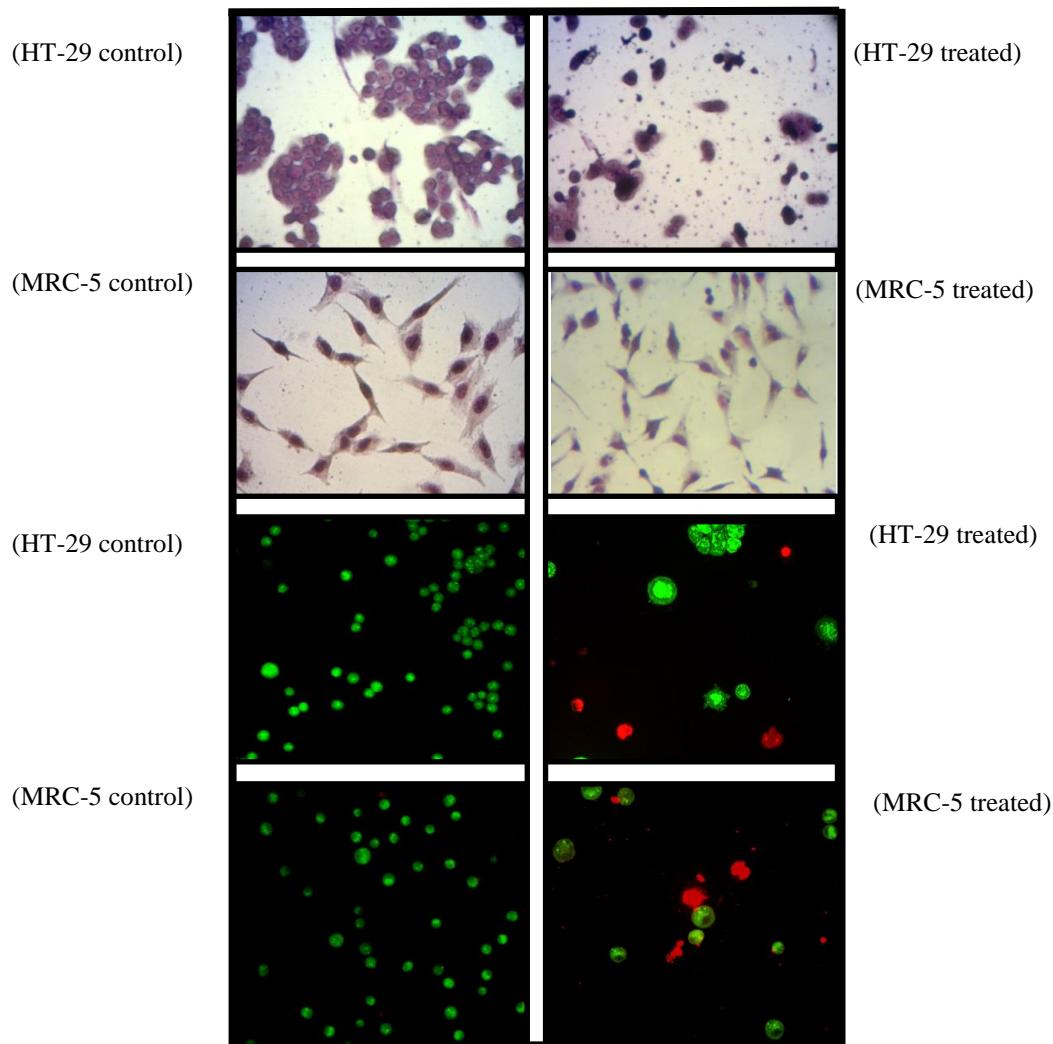


Fig. 5. Morphologically changes in HT-29 tumor cell line fixed and stained with Giemsa (first line) and with acridine orange/ethidium bromide (third line). MRC-5 non-tumor cell line stained with Giemsa (second line) and with acridine orange/ethidium bromide (fourth line) treated for 24 h with ExtWB at IC50 ($\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) compared to negative control. Photomicrographs were taken under light microscopy (200x). The first column refers to the negative controls (untreated group) and the second column refers to treated cells lines (IC50).

Table 1. Structure identification of anthocyanins from skin and whole extract by ESI-QTOF MS/MS.

peak #	RT (min.)	identified compound ^a	monoisotopic mass (u)	found mass (ppm)	MS ² fragment ion (ppm)
1	9.1	delphinidin-3- <i>O</i> -galactoside	465.1028	465.1012 [M] ⁺ (-3.4)	303.0495 [M – galactosyl group] ⁺ (-1.3)
2	10.2	delphinidin-3- <i>O</i> -glucoside	465.1028	465.1018 [M] ⁺ (-2.1)	303.0492 [M – glucosyl group] ⁺ (-2.3)
3A	11.6	delphinidin-3- <i>O</i> -arabinoside	435.0922	435.0908 [M] ⁺ (-3.2)	303.0492 [M – arabinosyl group] ⁺ (-2.3)
3B	11.6	cyanidin-3- <i>O</i> -galactoside	449.1078	449.1072 [M] ⁺ (-2.2)	287.0552 [M – galactosyl group] ⁺ (0.7)
4A	13.0	petunidin-3- <i>O</i> -galactoside	479.1184	479.1169 [M] ⁺ (-3.1)	317.0648 [M – galactosyl group] ⁺ (-2.5)
4B	13.0	cyanidin-3- <i>O</i> -glucoside	449.1078	449.1072 [M] ⁺ (-0.6)	287.0547 [M – glucosyl group] ⁺ (-1.1)
5A	14.2	petunidin-3- <i>O</i> -glucoside	479.1184	479.1168 [M] ⁺ (-3.3)	317.0642 [M – glucosyl group] ⁺ (-4.4)
5B	14.2	cyanidin-3- <i>O</i> -arabinoside	419.0973	419.0981 [M] ⁺ (1.9)	287.0541 [M – arabinosyl group] ⁺ (-3.1)
6A	15.6	petudidin-3- <i>O</i> -arabinoside	449.1078	449.1071 [M] ⁺ (-1.5)	317.0649 [M – arabinosyl group] ⁺ (-2.2)
6B	15.6	peonidin-3- <i>O</i> -pyranoside	463.1235	463.1224 [M] ⁺ (-2.4)	301.0695 [M – pyranosyl group] ⁺ (-3.9)
7	17.0	malvidin-3- <i>O</i> -galactoside	493.1341	493.1335 [M] ⁺ (-1.2)	331.0818 [M – galactosyl group] ⁺ (1.8)
8	19.2	malvidin-3- <i>O</i> -glucoside	493.1341	493.1337 [M] ⁺ (-0.8)	331.0801 [M – glucosyl group] ⁺ (-3.3)
9	22.2	malvidin-3- <i>O</i> -arabinoside	463.1235	463.1221 [M] ⁺ (-3.0)	331.0806 [M – arabinosyl group] ⁺ (-1.8)
10	25.0	delphinidin-3- <i>O</i> -(6"-acetyl)glucoside	507.1133	507.1127 [M] ⁺ (-1.2)	303.0488 [M – (6"-acetyl)glucosyl group] ⁺
11	27.0	malvidin-3- <i>O</i> -xyloside	463.1235	463.1228 [M] ⁺ (-1.5)	(-3.6) 331.0805 [M – xylosyl group] ⁺ (-2.1)
12	27.8	delphinidin-3- <i>O</i> -hexoside isomer	465.1028	465.1023 [M] ⁺ (-1.1)	303.0491 [M – hexosyl group] ⁺ (-2.6)
13A	28.2	petunidin-3- <i>O</i> -(6"-acetyl)hexoside	521.1290	521.1276 [M] ⁺ (-2.7)	317.0644 [M – (6"-acetyl)hexosyl group] ⁺
13B	28.2	malvidin-3- <i>O</i> -(6"-acetyl)galactoside	535.1446	535.1431 [M] ⁺ (-2.8)	(-3.8) 331.0802 [M – (6"-acetyl)galactosyl group] ⁺
14A	30.3	malvidin-3- <i>O</i> -(6"-acetyl)glucoside	535.1446	535.1437 [M] ⁺ (-1.7)	(-3.0) 331.0806 [M – (6"-acetyl)glucosyl group] ⁺
14B	30.3	peonidin-3- <i>O</i> -(6"-acetyl)hexoside	505.1341	505.1327 [M] ⁺ (-2.8)	(-1.8) 301.0693 [M – (6"-acetyl)hexosyl group] ⁺
14C	30.3	petunidin-3- <i>O</i> -(6"-coumaroyl)hexoside	625.1552	625.1529 [M] ⁺ (-3.7)	(-4.7) 317.0641 [M – (6"-coumaroyl)hexosyl group] ⁺ (-4.7)

RT = retention times correspond to those indicated in the LC chromatogram (Figure 1); u = unified atomic mass unit

Table 2. Structure identification of citric acid and polyphenolic compounds identified in pulp and whole extract by ESI-QTOF MS/MS.

peak #	RT (min.)	identified compound	monoisotopic mass (u)	found mass (ppm)	MS ² fragment ion (ppm)
1	2.2	citric acid	192.0276	191.0178 [M-H] ⁻ (-4.2)	not determined
2	7.3	chlorogenic acid isomer	354.0951	383.0439 [2M-H] ⁻ (-4.7) 353.0854 [M-H] ⁻ (-3.7) 707.1782 [2M-H] ⁻ (-4.9)	191.0545 [M-H - caffeoyl group] ⁻ (-2.6)
3	9.4	quercetin-3-O-galactoside	464.0954	463.0853 [M-H] ⁻ (-3.9)	(quinic acid) 301.0331 [M-H - galactosyl group] ⁻ (-3.6)
4	11.8	chlorogenic acid isomer	354.0951	353.0858 [M-H] ⁻ (-2.5) 707.1792 [2M-H] ⁻ (-3.7)	(quercetin) 191.0541 [M - caffeoyl group] ⁻ (-4.7)
5	8.9	proanthocyanidin dimer	578.1424	577.1312 [M-H] ⁻ (-4.8)	(quinic acid)
6	13.4	proanthocyanidin dimer	578.1424	577.1317 [M-H] ⁻ (-3.9)	425.0853 [M-H] ⁻ (-2.3)
7	15.9	chlorogenic acid isomer	354.0951	353.0851 [M-H] ⁻ (-4.5) 707.1795 [2M-H] ⁻ (-3.2)	425.0849 [M-H] ⁻ (-4.2) 191.0543 [M-H - caffeoyl group] ⁻ (-3.7)
8	28.5	quercetin-3-O-glucoside	464.0954	463.0853 [M-H] ⁻ (-3.9)	(quinic acid) 301.0333 [M-H - glucosyl group] ⁻ (-2.3)
9	29.1	laricitrin-3-O-hexoside	494.1060	493.0953 [M-H] ⁻ (-4.6)	(quercetin) 331.0431 [M-H - hexosyl group] ⁻ (-5.1)
10	31.2	quercetin-3-O-arabinoside	434.0849	433.0752 [M-H] ⁻ (-3.0)	(laricitrin) 301.0328 [M-H - arabinosyl group] ⁻ (-4.6)
11	31.5	quercetin-3-O-(6"-acetyl)hexoside	506.1060	505.0989 [M-H] ⁻ (2.6) (-6.3)	(quercetin) 301.0323 [M-H - (6"-acetyl)hexosyl group] ⁻
12	32.0	syringetin-3-O-hexoside	508.1216	507.1157 [M-H] ⁻ (4.7)	(quercetin) 345.0618 [M-H - hexosyl group] ⁻ (4.0)
					(syringetin)

RT = retention times correspond to those indicated in the LC chromatogram (not shown); u = unified atomic mass unit.

Table 3
 IC_{50} ($mg.mL^{-1}$) after 24 h treatment with ExtSB, ExtWB and ExtPB in different cell lines. Cell viability was assessed by MTT assay.

Cell line	IC_{50} ExtSB ($mg.mL^{-1}$)	IC_{50} ExtWB ($mg.mL^{-1}$)	IC_{50} ExtPB ($mg.mL^{-1}$)
Tumor			
HeLa	$0.716 \pm 0.005^{(b)}$	$0.740 \pm 0.009^{(b)}$	$1.687 \pm 0.004^{(b)}$
Hep-2	$0.956 \pm 0.008^{(a)}$	$0.880 \pm 0.003^{(a)}$	$2.052 \pm 0.020^{(a)}$
HT-29	$0.613 \pm 0.007^{(c)}$	$0.474 \pm 0.010^{(c)}$	$1.899 \pm 0.128^{(a)}$
Non Tumor			
MRC-5	> 5.00	> 5.00	> 5.00

Letters correspond to statistically significant differences using ANOVA-Tukey test ($p \leq 0.05$).

References

- Afaq, F., D. N. Syed, A. Malik, N. Hadi, S. Sarfaraz, M. H. Kweon, N. Khan, M. A. Zaid and H. Mukhtar (2007). "Delphinidin, an anthocyanidin in pigmented fruits and vegetables, protects human HaCaT keratinocytes and mouse skin against UVB-mediated oxidative stress and apoptosis." *J Invest Dermatol* **127**(1): 222-232.
- Alley, M. C., D. A. Scudiero, A. Monks, M. L. Hursey, M. J. Czerwinski, D. L. Fine, B. J. Abbott, J. G. Mayo, R. H. Shoemaker and M. R. Boyd (1988). "Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay." *Cancer Res* **48**(3): 589-601.
- Bian, Y., Ballington, J., Raja, A., Brouwer, C., Reid, R., Burke, M., Brown. (2014). "Patterns of simple sequence repeats in cultivated blueberries (*Vaccinium* section *Cyanococcus* spp.) and their use in revealing genetic diversity and population structure." *Molecular Breeding*, 25 March 2014.
- Bunea, A., D. Rugina, Z. Sconta, R. M. Pop, A. Pintea, C. Socaciu, F. Tabaran, C. Grootaert, K. Struijs and J. VanCamp (2013). "Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells." *Phytochemistry* **95**: 436-444.
- Buran, Timothy J., Sandhu, Amandeep K., Li, Zheng, Rock, Cheryl R., Yang, Weihua W., & Gu, Liwei. (2014). "Adsorption/desorption characteristics and separation of anthocyanins and polyphenols from blueberries using macroporous adsorbent resins". *Journal of Food Engineering* **128**: 167.
- Callemien, D. and S. Collin (2008). "Use of RP-HPLC-ESI(-)-MS/MS to Differentiate Various Proanthocyanidin Isomers in Lager Beer Extracts". *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **215**: 1-7.

- Dastmalchi, K., G. Flores, V. Petrova, P. Pedraza-Penalosa and E. J. Kennelly (2011). "Edible neotropical blueberries: antioxidant and compositional fingerprint analysis." *J Agric Food Chem* **59**(7): 3020-3026.
- Dragovic-Uzelac, Verica, Savic, Zvonimir, Brala, Ana, Levaj, Branka, Kovacevic, Danijela Bursac, & Bisko, Ante. (2010). "Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity of blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in the Northwest Croatia.(original scientific paper)(Report). *Food Technology and Biotechnology* **48**(2): 214.
- Faria, A., Pestana, D., Teixeira, D., De Freitas, V., Mateus, N., & Calhau, C. (2010). "Blueberry Anthocyanins and Pyruvic Acid Adducts: Anticancer Properties in Breast Cancer Cell Lines". *Phytotherapy Research* **24**(12): 1862-1869.
- Gavrilova, V., M. Kajdžanoska, V. Gjamovski and M. Stefova (2011). "Separation, Characterization and Quantification of Phenolic Compounds in Blueberries and Red and Black Currants by HPLC-DAD-ESI-MSn." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **59**(8): 4009-4018.
- Giovanelli, G., & Buratti, S. (2009). "Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties". *Food Chemistry* **112**(4): 903-908.
- Giusti, M. M., L. E. Rodríguez-Saona, D. Griffin and R. E. Wrolstad (1999). "Electrospray and Tandem Mass Spectroscopy As Tools for Anthocyanin Characterization." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**(11): 4657-4664.
- Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, M., & Kobori. (2003). "Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(1): 68-75.
- Lopez-Alarcon, C., & Denicola, A. (2013). "Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays". *Analytica Chimica Acta* **763**: 1-10.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." *Cell* **144**(5): 646-674.
- He, Y. C., F. L. Zhou, Y. Shen, D. F. Liao and D. Cao (2014). "Apoptotic death of cancer stem cells for cancer therapy." *Int J Mol Sci* **15**(5): 8335-8351.
- Ma, C., K. Dastmalchi, G. Flores, S.-B. Wu, P. Pedraza-Peñalosa, C. Long and E. J. Kennelly (2013). "Antioxidant and Metabolite Profiling of North American and Neotropical Blueberries Using LC-TOF-MS and Multivariate Analyses". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **61**(14): 3548-3559.

- Manganaris, G., Goulas, V., Vicente, A., & Terry, L. (2014). "Berry antioxidants: Small fruits providing large benefits". Journal of the Science of Food and Agriculture **94**(5): 825-833.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., et al. (1991). "Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines". J. Natl. Cancer Inst. **83**: 757-766.
- Nicoué, E. É., S. Savard and K. Belkacemi (2007). "Anthocyanins in Wild Blueberries of Quebec: Extraction and Identification." Journal of Agricultural and Food Chemistry **55**(14): 5626-5635.
- Nguyen, V., Tang, J., Oroudjev, E., Lee, C., Marasigan, C., Wilson, L., & Ayoub, G. (2010). "Cytotoxic Effects of Bilberry Extract on MCF7-GFP-Tubulin Breast Cancer Cells". Journal of Medicinal Food **13**(2): 278-285.
- Olsson, M. E., K. E. Gustavsson, S. Andersson, A. Nilsson and R. D. Duan (2004). "Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels." J Agric Food Chem **52**(24): 7264-7271.
- Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Jacques, A. C., Vizzotto, M., Godoy, H. T., & Zambiasi, R. C. (2012). "Quantification of several bioactive compounds and antioxidant activities of six cultivars of brazilian blueberry".
- Pertuzatti, P. B., M. T. Barcia, D. Rodrigues, P. N. da Cruz, I. Hermosin-Gutierrez, R. Smith and H. T. Godoy (2014). "Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries." Food Chem **164**: 81-88.
- Seeram, N. P. (2008). "Berry fruits for cancer prevention: current status and future prospects." J Agric Food Chem **56**(3): 630-635.
- Seeram, N. P., L. S. Adams, Y. Zhang, R. Lee, D. Sand, H. S. Scheuller and D. Heber (2006). "Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro." J Agric Food Chem **54**(25): 9329-9339.
- Skupien, K., J. Oszmianski, D. Kostrzewska-Nowak and J. Tarasiuk (2006). "In vitro antileukaemic activity of extracts from berry plant leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells." Cancer Lett **236**(2): 282-291.
- Srivastava, A., C. C. Akoh, J. Fischer and G. Krewer (2007). "Effect of anthocyanin fractions from selected cultivars of Georgia-grown blueberries on apoptosis and phase II enzymes." J Agric Food Chem **55**(8): 3180-3185.
- Routry, W., & Orsat, V. (2014). "Variation of phenolic profile and antioxidant activity of North American highbush blueberry leaves with variation of time of harvest and cultivar". Industrial Crops and Products **62**: 147-155.

- Rugina, D., Sconta, Z., Leopold, L., Pintea, A., Bunea, A., & Socaciu, C. (2012). Antioxidant Activities of Chokeberry Extracts and the Cytotoxic Action of Their Anthocyanin Fraction on HeLa Human Cervical Tumor Cells. *Journal of Medicinal Food* **15**(8): 700-706.
- Tian, Q., M. M. Giusti, G. D. Stoner and S. J. Schwartz (2005). "Screening for anthocyanins using high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry with precursor-ion analysis, product-ion analysis, common-neutral-loss analysis, and selected reaction monitoring." *Journal of Chromatography A* **1091**(1–2): 72-82.
- To, K. (2013). "MicroRNA: A prognostic biomarker and a possible druggable target for circumventing multidrug resistance in cancer chemotherapy". *Journal of Biomedical Science* **20**(1)
- Wang, L., Gao, S., Jiang, W., Luo, C., Xu, M., Bohlin, Huang. (2014). "Antioxidative dietary compounds modulate gene expression associated with apoptosis, DNA repair, inhibition of cell proliferation and migration". *International Journal of Molecular Sciences* **15**(9): 16226-16245.
- Wu, X. and R. L. Prior (2005). "Systematic Identification and Characterization of Anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in Common Foods in the United States: Fruits and Berries." *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(7): 2589-2599.
- Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., & Akoh, C. (2005). Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(18); 7320-7329.
- Yun, J., Afaq, F., Khan, N., & Mukhtar, H. (2009). Delphinidin, an Anthocyanidin in Pigmented Fruits and Vegetables, Induces Apoptosis and Cell Cycle Arrest in Human Colon Cancer HCT116 Cells. *Molecular Carcinogenesis* **48**(3): 260-270.

4.2 Capítulo II

Blueberry of cultivar Misty (Southern Highbush): cytotoxic activity and inducing of apoptosis in mammalian cells

Giovana Massarotto^a, Thiago Barcellos^b, Tiane Finimundy^a, Ana Paula Carneiro

Brandalize^a, Sidnei Moura^b, Joséli Schwambach^b, João Antonio Pêgas Henriques^a and
Mariana Roesch-Ely^{a*}

^aLaboratory of Genomics, Proteomics and DNA Repair, Biotechnology Institute,
University of Caxias do Sul, RS, Brazil.

^b Laboratory of Biotechnology of Natural and Synthetic Products, Biotechnology
Institute, University of Caxias do Sul, RS, Brazil.

*Corresponding author: Mariana Roesch-Ely, Laboratório de Genômica, Proteômica e
Reparo de DNA, Universidade de Caxias do Sul, Rua Francisco Getúlio Vargas 1130,
CEP 95070-560, Caxias do Sul, RS, Brasil. Phone: +55-54-3218-2100, Fax: +55-54-
3218-2664. E-mail address: mrely@ucs.br.

ABSTRACT

Blueberry has been planted in south Brazil more systematically for the last decades. This cultivation was intensified because its good adaptability to the Southern Brazilian climate. Blueberries are considered to be one of the richest sources of phenolic compounds, and they contain significant levels of anthocyanins, flavonols, chlorogenic acid and proanthocyanidins, which have high biological activity. Diets rich in phenolic compounds are associated with lower risks of several chronic diseases, including cancer. Here, the antiproliferative potential and apoptosis induction effects of methanolic extracts were evaluated against tumor cell lines Hep-2, HeLa and HT-29 and non-tumor cell line MRC-5. The extract resulted in 50% inhibition of cell proliferation (IC_{50}) at concentrations of $345.68 \mu\text{g.mL}^{-1}$ in Hep-2, $305.25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ in HeLa and $248.29 \mu\text{g.mL}^{-1}$ in HT-29, and the obtained IC_{50} was higher than $900.00 \mu\text{g.mL}^{-1}$ for MRC-5. Blueberry extracts also resulted in cellular changes with induction of apoptosis after 72h extract treatment. These findings suggest that blueberry intake may reduce cancer risk.

Key words: apoptosis, cancer, chemical, blueberry

1. Introduction

Blueberry is extensively cultivated in the United States and has been commercially produced for many years, while recently the areas planted with blueberries in Brazil have systematically been increased (Kader et al. 1996; Dragovic-Uzelac et al. 2010; Pertuzatti et al. 2012). This cultivation was intensified due to its good adaptability to the Southern Brazilian climate. This specie requires less amount of cold weather for its development (Galletta and Ballington 1996); favoring the potential

to produce blueberries throughout the year in Brazil (Pertuzatti et al. 2012). Actually, most of the Brazilian blueberries produced are consumed *in natura* or are exported. In this study, samples taken from the cultivar Southern Highbush, located in the South Brazil (Vacaria city) were investigated.

Recent evidence biological effects of natural products suggests that the combination of phytochemicals in fruits and vegetables are associated with antioxidant, anti-inflammatory, and anticancer activity (Yi et al. 2005; Seeram et al. 2006; Müller et al., 2012). Phenolics acids, flavonoids, and anthocyanins in particular, may contribute to this effect (Yi et al. 2005). Blueberries are considered to be one of the richest sources of phenolic compounds, presenting high biological activity. The predominant flavonoids found in blueberries are anthocyanins and flavonols (Dragovic-Uzelac et al. 2010).

Anthocyanins are naturally occurring water-soluble secondary metabolites that are generally concentrated in the skins of fruits, and their content are usually proportional to color intensity (Del Bo' et al. 2012; Triebel et al. 2012). These compounds possess significant antioxidant capacity as demonstrated in several *in vitro* and *in vivo* studies. Moreover, anthocyanins play a potential beneficial role in human health by reducing risks of many diseases, such as cardiovascular diseases and cancer (Del Bo' et al. 2012).

Apoptosis is a programmed cell death characterized by a series of distinct morphological and biochemical alterations. This process is essential for morphogenesis, tissue homeostasis and host defense, playing a significant role in the elimination of seriously damaged cells or tumor cells by chemopreventive agents. Accumulating

evidence suggests that defects in apoptosis may lead to several pathologies, including some forms of cancer.

The aim of this study was to evaluate the bioactivity of methanolic extract taken from samples of Brazilian Southern highbush blueberry, and assess its potential cytotoxic and apoptosis on tumoral and non-tumoral cells lines after 72 hours of treatment.

2. Material and methods

2.1. Blueberry sample

Ripened samples of blueberries were collected in november 2012 in Vacaria, state of Rio Grande do Sul, Brazil (Lat. 28°30'44"S by Lon. 50°56'02"W), and stored at University of Caxias do Sul (UCS) for subsequent realization of experiment. To preserve the berries, they were immediately frozen the whole fruits and stored at - 80°C after picking.

2.2. Blueberry extracts

The blueberry extract (ExtMB) was prepared from the whole fruit in methanol solution. About 5 g of fresh blueberry samples and 30 ml of 80:20 (v/v) methanol–water solution containing 0.1 mL⁻¹ acetic acid were added to a tube with a screw cap and grounded by polytron. The mixture (total volume of 30 mL) was placed in the dark for 16 h. After sonication for 15 min, the samples were centrifuged at 2000 rpm (RPMs) for 10 min. The supernatants were again centrifuged at 5000–6000 RPMs for 20 min. The second supernatants were evaporated under reduced pressure and stored at -20°C until lyophilization according to Huang et al. 2008. The dry extract was stored at -20 °C for

further experiments. The dried extract was resuspended in 50% (v/v) hydroalcoholic solution. The different solutions were filtered through a 0.22 µm polyethersulfone membrane (TPP, Techno Plastic Products, Switzerland).

2.3. Cytotoxic assay

Cell viability was measured using the MTT assay, which is based on the conversion of MTT to formazan crystals by mitochondrial dehydrogenases (Mosmann 1983, Alley et al. 1988). Briefly, tumor (Hep-2, HeLa, HT-29) and non-tumor (MRC-5) cells were seeded at a density of 1×10^5 cells per well in 100 µL of supplemented culture media. After 24 h, cells were treated with different concentrations ($5\text{-}900 \mu\text{g.mL}^{-1}$) of ExtMB. Negative controls were treated with the same amounts of hydroalcoholic solution without extract, incubated at 37 °C, in 5%, CO₂ for 72h. The medium was removed and 1 mg.mL⁻¹ MTT dye in serum-free medium was added to the wells. Plates were incubated at 37 °C for 2 h in humidified 5 % CO₂ atmosphere. Subsequently, the MTT solution was dissolved in 100 µL DMSO. Absorbance was measured using a microplate reader at 570 nm (Spectra Max190, Molecular Devices, USA). The percentage of growth inhibition was calculated as: cell viability (%) = (absorbance of experimental wells/absorbance control wells) x 100. The IC₅₀ ratio was also calculated using equation developed by Monks et al. (1991). Each experiment was performed in triplicate for three independent times.

2.4 Induction of apoptosis using acridine orange/ethidium bromide (AO/EB) stain

Hep-2, HeLa, HT-29 and MRC-5 cells were seeded (1×10^5 cells per well) in six well plates and incubated for 72 h, at 37 °C, in 5% CO₂. The cells were treated with concentrations of ExtMB in IC₅₀ to followed by incubation at 37 °C, in 5% CO₂, for 72

h. For technical acridine orange/ethidium bromide. After that, the cells were detached with trypsin and washed twice with phosphate buffer saline (PBS). Twenty μ L of cells (Hep-2, HeLa, HT-29 and MRC-5) were mixed with 2 μ L of AO ($100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) and 2 μ L EB ($100 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$) on the glass. The viable cells, early and late apoptosis and necrosis were visualized under a fluorescence microscope (BX43, Olympus) with 200X magnification. The experiment was performed in triplicate for three times for each cell line, and two hundred cells were counted.

2.5. Statistical analysis

Results were expressed as mean \pm standard deviation obtained from three independent experiments. Statistical differences observed between groups for cytotoxicity assay were evaluated using independent t-test and oneway analysis of variance (ANOVA), with post hoc test for multiple comparisons (Tukey). Independent t-test was also used to compare the differences for apoptotic and necrotic cells between treated and untreated control, as well as to compare the same differences between treated tumoral and non-tumoral cell lines. Significance was accepted at p lower than 0.05 using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS, version 20.0) for Windows.

3. Results and discussion

We have previously identified the chemical compounds in blueberry sample through ESI-QTOF MS/MS (unpublished data). Chemical identification the whole blueberry methanolic extracts (ExtMB) revealed the presence of anthocyanins concentrated in the skin and other chemical compounds as quercetin glycosides,

proanthocyanins dimers, citric and chlorogenic acid in the pulp. The major compounds identified previously by our group are listed below in **Table 1**.

Table 1. Compounds identified in blueberry methanolic extract (ExtMB) of blueberry for by ESI-QTOF MS/MS.

RT (min.)	Identified compound	Monoisotopic mass (u)	Found mass (ppm)
9.1	delphinidin-3	465.1028	465.1012 [M] ⁺ (-3.4)
11.6	cyanidin-3	449.1078	449.1072 [M] ⁺ (-2.2)
13.0	petunidin-3	479.1184	479.1169 [M] ⁺ (-3.1)
15.6	peonidin-3	463.1235	463.1224 [M] ⁺ (-2.4)
17.0	malvidin-3	493.1341	493.1335 [M] ⁺ (-1.2)
7.3	chlorogenic acid isomer	354.0951	353.0854 [M-H] ⁻ (-3.7)
			707.1782 [2M-H] ⁻ (-4.9)
9.4	quercetin-3-O-galactoside	464.0954	463.0853 [M-H] ⁻ (-3.9)
11.8	chlorogenic acid isomer	354.0951	353.0858 [M-H] ⁻ (-2.5)
			707.1792 [2M-H] ⁻ (-3.7)
8.9	proanthocyanidin dimer	578.1424	577.1312 [M-H] ⁻ (-4.8)
29.1	laricitrin-3-O-hexoside	494.1060	493.0953 [M-H] ⁻ (-4.6)
32.0	syringetin-3-O-hexoside	508.1216	507.1157 [M-H] ⁻ (4.7)

3.1. Cytotoxicity assay

For cytotoxicity activity assays used extract (ExtMB) in concentration of 50% of inhibitory (IC50). The concentration varied according to each tumor cell line

investigated. The HT-29 revealed the lower IC₅₀ ($248.29 \pm 5.38 \mu\text{g.mL}^{-1}$), whereas Hep-2 presented the highest one ($345.68 \pm 8.88 \mu\text{g.mL}^{-1}$) (**Figure 1**). Non-tumor line values were superior to $900.00 \mu\text{g.mL}^{-1}$, indicating a selective cytotoxic activity (**Table 2**).

Table 2. IC₅₀ values – 50% inhibitory concentration obtained in the MTT assay for tumor (HT-29, Hep-2, HeLa) and non-tumor cell (MRC-5) after 72 h treatment with metanolic whole blueberry extract (ExtMB).

Cell line	IC50 ExtMB ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
Tumor	
HT-29	248.29 ± 5.38
Hep-2	345.68 ± 8.88
HeLa	305.25 ± 3.34
Non Tumor	
MRC-5	> 900.00

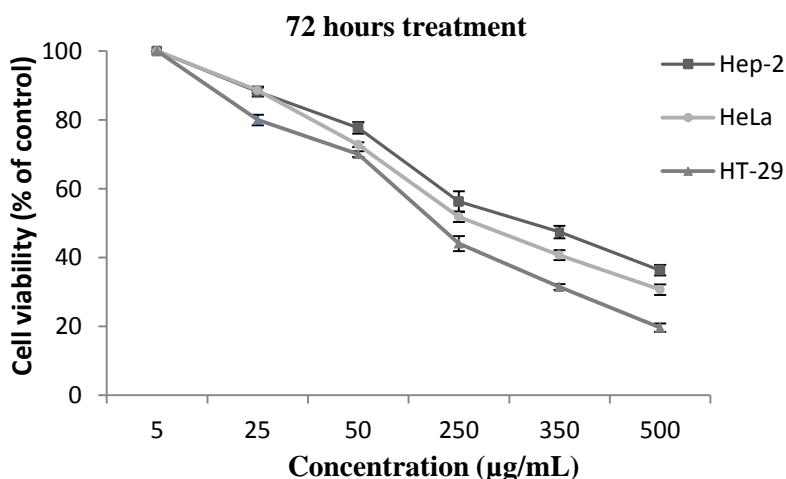


Figure 1. Effect of metanolic whole blueberry extract (ExtMB) on the cell viability (%) in tumor cell line Hep-2, HeLa and HT-29. Cells were treated with specific concentrations of ExtMB for 72 hours, and cell viability was determined by MTT assay. The values are represented as the percentage cell inhibition where vehicle treated cells were regarded as 100%. The data represents the mean \pm SD of three independent experiment each conducted in triplicate.

The inhibitory effect in MCF7 (human breast cancer cells) due to bilberry extract dissolved in 70% ethanol was determined using a sulforhodamine B assay after

72 hours in contact with the indicated drug concentrations. This was observed by Nguyen et al. (2010), with IC₅₀ of 0.43 mg.mL⁻¹. Extract of bilberry (*Vaccinium myrtillus*) in contact with HCT116 cells (human colon carcinoma cells) did not inhibited growth when used in a concentration of 0.5-2.0 mg.mL⁻¹ after 24 h treatment, but when the incubation time was extended to 48 h, the inhibition was observed at 1.4 mg.mL⁻¹ (Katsume et al. 2003).

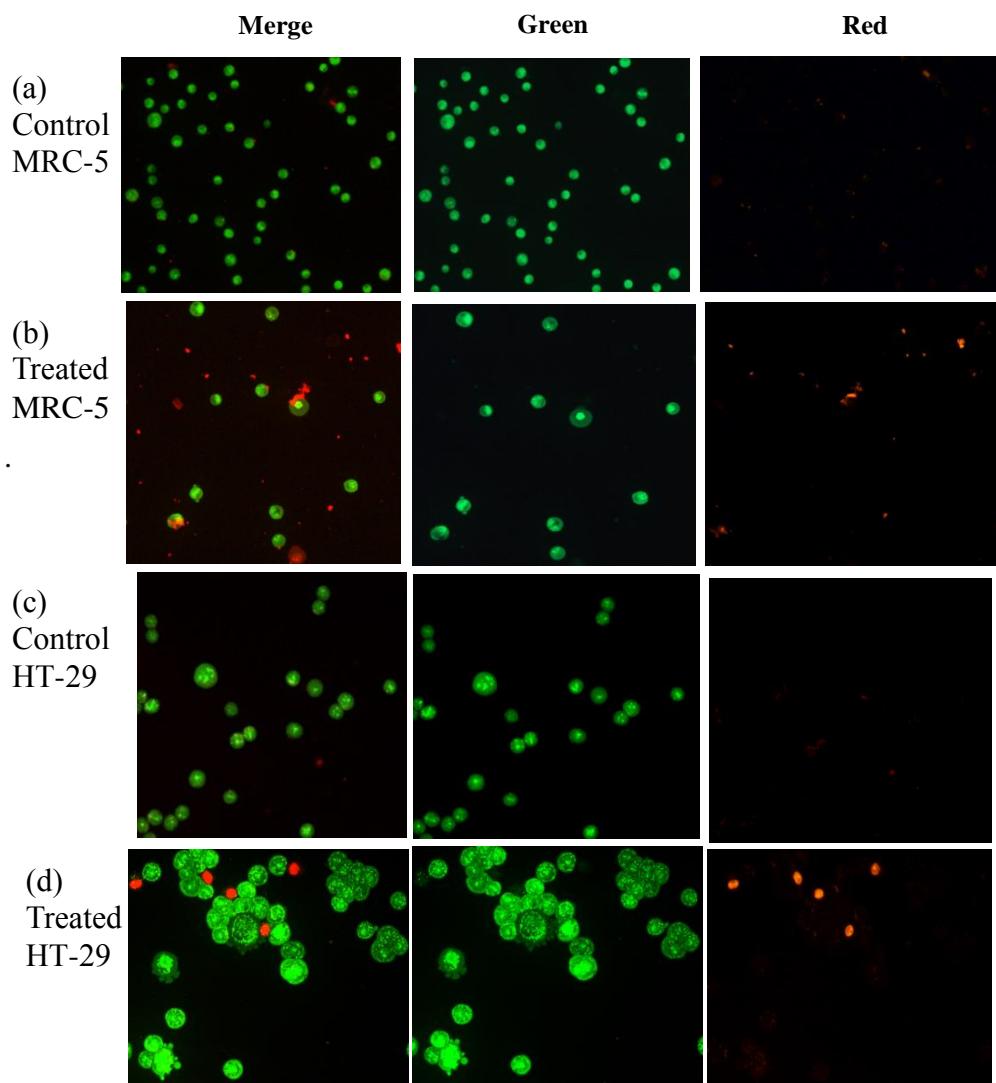
The resistance of HL60 cells (human leukemia cells) to extracts of strawberry, raspberry and blueberry when incubated for 72 h was studied by Skupien et al. (2006) observed. The blueberry species used in the study was *Vaccinium corymbosum* (L.). It was found that the blueberry extract was more effective against the HL60 cell line (about 2-fold more active than extracts from strawberry and raspberry), having an IC₅₀ of 0.240 g.L⁻¹. Zhao et al. (2004) reported increased cell death in HT-29 cells (colon cancer cell lines) when compared to non-tumor colon NCM460 cell line using anthocyanin-rich extracts, after 24, 48 and 72 h of exposition. The treatment of HT-29 with 75 µg of anthocyanin.mL⁻¹ inhibited 15%, 51% and 73% the proliferation of cells after 24, 48 and 72 h, respectively. In contrast, growth of NCM460 cells was not significantly inhibited after 24 or 48 h at any concentration, but was inhibited by all concentrations (25, 50, and 75 µg of anthocyanin.mL⁻¹) after 72 h of incubation.

The presence of large amounts of anthocyanins, as cyanidin-3-galactoside, delphinidin-3-galatoside, petunidin-3-galactoside, 3-glucoside-petunidin, petunidin-3-arabinoside, peonidin- 3-galactoside, malvidin-3-galactoside, malvidin 3-glucoside, malvidin-3-arabinoside, and condensed tannins (proanthocyanidins) is related to the inhibitory effects of blueberry extracts on tumor cell lines CAL-2 and KB, HT-29 and HCT116, MCF-7 and LNCaP, showed IC₅₀ of 177.40, 171.30, 89.96, 90.00, 169.90 and

$36.45 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectively when incubated for 48 h (Seeram et al., 2006). A recent report using extracts of Highbush blueberries, of the Toro cultivar, with B16-F10 melanoma murine cells with an incubation time of 24 h showed a higher IC₅₀ of 615.2 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Bunea et al. 2013).

3.4. Apoptosis analysis after whole methanol extract exposure

We monitored morphological alterations on the cells after ExtMB treatment with IC₅₀ compared to the untreated groups. The morphological Changes include cell shrinkage and apoptotic body formation, suggesting the induction of apoptosis as a consequence of extracts exposure. Vehicle were treated exclusively with and hydroalcoholic solvent 50% (v/v) did not present alterations on cell morphology. However, morphological changes were more expressive in tumor cells when compared a non-tumor cells (**Figure 2**)



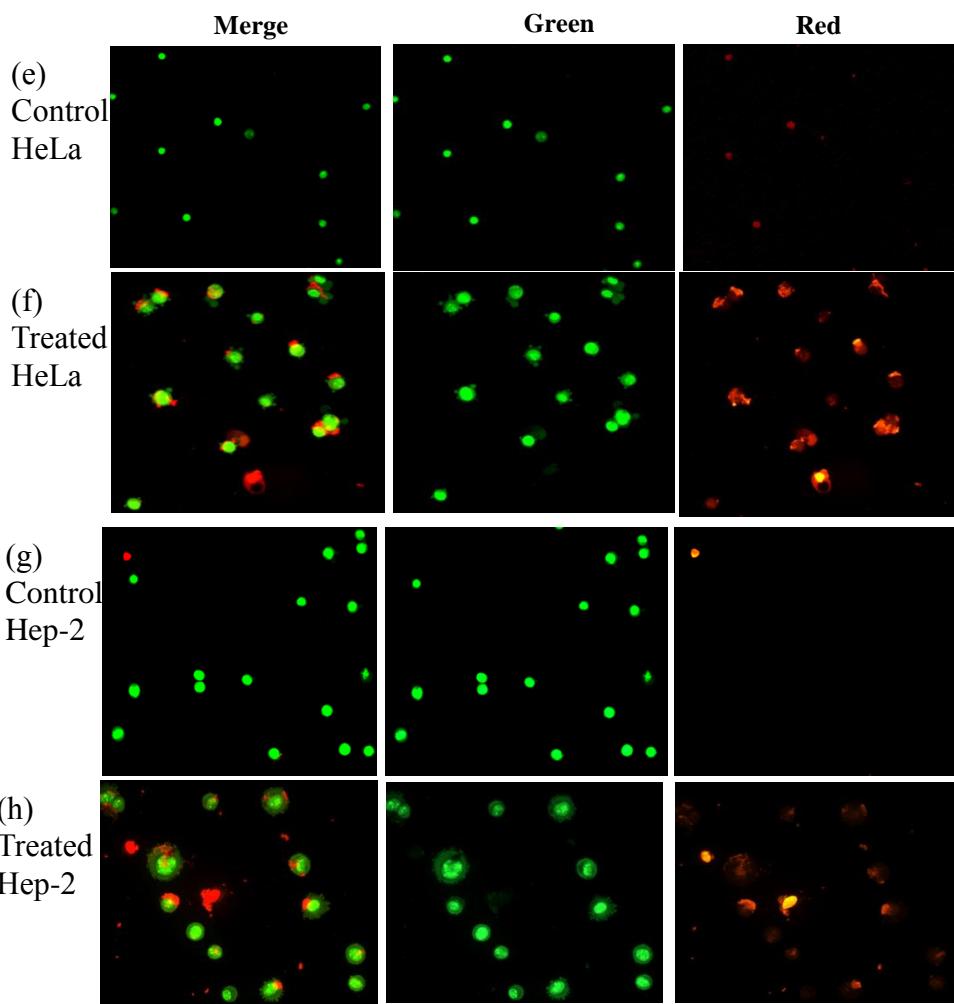


Figure 2. Morphologically changes of cells treated for 72 h with ExtMB at IC₅₀ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) compared to negative control. Letters a, c, and g indicate the negative controls, and letters b, d, f and h indicate different cell lines treated. Letters a, b: MRC-5 cell line. c, d: HT-29 cell line. e, f: HeLa cell line. g, h: Hep-2 cell line. Photomicrographs were taken under light microscopy (200x).

The apoptotic potential was assessed by AO/EB staining in tumor and non-tumor cells treated with ExtMB, using IC₅₀, for 72 h. Signaling for cell death was observed in most cell streated with ExtMB, becoming more evident when compared to the untreated control group. The percentage of cells viably, early apoptosis, late apoptosis and necrosis are represented in **Figure 3** and the percentages of early apoptotic, late apoptototic and necrotic cells were statically significant higher for all cell lines when they were treated with their respective IC₅₀. At the same time.

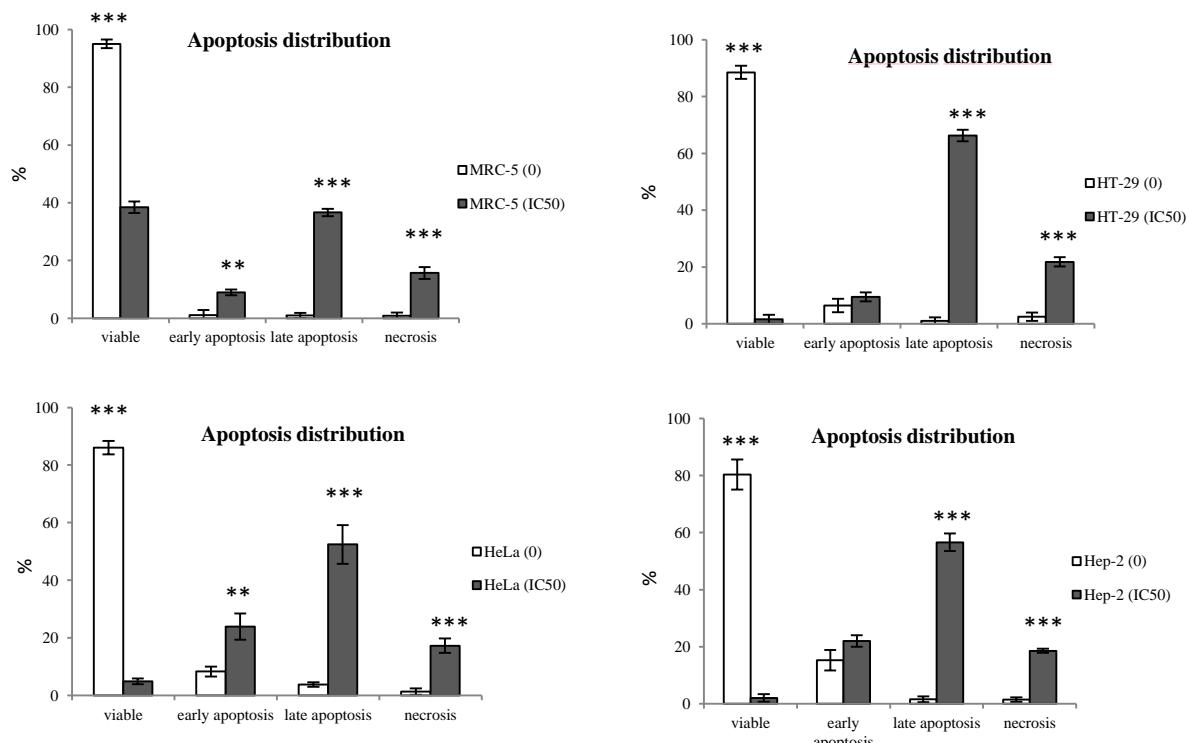


Figure 3. Percent of cells viably, in early apoptosis, late apoptosis and necrosis with AO/EB assay in MRC-5 (non-tumor cell) and HT-29, HeLa and Hep-2 (tumor cells) treated with IC₅₀ ExtMB for 72 hours and their untreated control. Statistical differences between treated with IC₅₀ and their untreated control, *p<0.01, **p<0.001 and ***p<0.0001.

Among the phenolic compounds of the blueberry, the anthocyanins were shown to be the most potent inhibitors of cell proliferation and inducer of apoptosis when used in relatively pure form against colon cancer cell lines (Yi et al. 2005; Srivastava et al. 2007). After 24 h of incubation, HL60 cells with 4 mg.mL⁻¹ of *Vaccinium myrtillus*

ethanolic extract, demonstrating the apoptosis-inducing effect on leukemia cells HL60. The flavonols kaempferol, quercetin and kaempferol, contained in *Vaccinium myrtillus*, have been reported to induce apoptosis in cancer cells. The effects of malvidin and delphinidin were stronger than the flavonols in HL60 cells. Since flavonol content is very low in *Vaccinium myrtillus*, apoptosis induction was probably due to the presence of anthocyanins. The cyanidin-3-glucoside anthocyanins and cyanidin-3,5-diglucoside, according to reports, are incorporated into human plasma with the maintenance of its structures (Katsume et al. 2003).

Seeram et al. (2006) evaluated the antiproliferative effects of methanol extracts of blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry and strawberry for human oral (KB and CAL27), breast (MCF-7), colon (HT29 and HCT116) and prostate (LNCaP) cancer cell lines incubated for 24 hours. The extent of inhibition of cell proliferation was found to vary markedly with types and cell line studied. The effects of the different berry extracts on cell apoptosis was assessed using HT29 cells that were treated with 200 µg.mL⁻¹ of each berry extract. The results indicated that only black raspberry induced apoptosis 3-fold over untreated controls, and strawberry extract induced apoptosis 2.8-fold over, blueberry 1.8-fold, blackberry 1.8-fold, and raspberry 1.7-fold, whereas cranberry extract demonstrated no pro-apoptotic activity. Thus, the blueberry extract produced a significant induction of apoptosis.

Apoptosis is an active, strictly regulated, and energy-dependent cell death process. The activation of caspase family proteins triggered by extrinsic and intrinsic signaling pathways results in a series of cellular substrate excision and changes, such as chromatin condensation, DNA fragmentation, membrane blebbing, and cell shrinkage. The process of driving the cell to apoptosis undergoes a series of steps with activation effectors of caspases. The assembly of cytochrome c and apoptotic protease-activating

factor-1 (Apaf-1) activates caspase-9, which in turn activates the effectors caspase-3, -6, and -7, leading to apoptosis (Chun He et al. 2014).

Chung et al. (2010) found that caspase-3-like activity on the cytosol fraction of HT-29 cells pretreated with 50 or 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ proanthocyanidins was significantly increased by 3 and 4 fold compared to control cells. Proanthocyanidins (PCs) or condensed tannins are mixtures of oligomers and polymers composed of flavan-3-ol units that have been shown to suppress growth and to induce apoptosis in colon cancer cells (HT-29). There was a significant effect of anthocyanins on caspase-3 activity with a response that was dose-dependent when HT-29 cell line treated with 150 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ anthocyanin fraction from the Tifblue, Powderblue, and Brightblue blueberries cultivars (Srivastava et al. 2007).

Thus, several factors may contribute to apoptosis induction, such as cell line type, concentrations of extract, stability of extract components in different media, length of treatment time, differential uptake of phenolics and generation of artifacts such as H_2O_2 . That must be considered when using cell culture studies to rank the chemopreventive activities of berry extracts (Stoner et al. 2008). The consumption of berries can also contribute to the maintenance of plasma levels of anthocyanins, which have antioxidant activity and inhibitory effects on the growth of cancer cells.

5. Conclusions

In conclusion, our study found that compounds presents in Misty blueberry cultivar with methanolic extract could inhibit tumor cell proliferation and induce apoptosis. Further studies are required to clarify the mechanisms involved in its antitumor activity and to evaluate the bioavailability and metabolism of compounds present in this extract.

Acknowledgments

We thank the Biotechnology Institute from the University of Caxias do Sul, CNPq and CAPES.

References

- Alley MC, Scudiero DA, Monks A, et al. (1988). Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Res* **48**(3): 589-601.
- Bunea, A., D. Rugina, Z. Sconta, R. M. Pop, A. Pintea, C. Socaciu, F. Tabaran, C. Grootaert, K. Struijs and J. VanCamp (2013). Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells. *Phytochemistry* **95**: 436-444.
- Chung, W., Miranda, C., Stevens, J., & Maier, C. (2010). Hop proanthocyanidins induce apoptosis, protein carbonylation, and cytoskeleton disorganization in human colorectal adenocarcinoma cells via reactive oxygen species. *Food and Chemical Toxicology* **47**(4): 827-836.
- Del Bo', C., Riso, P., Brambilla, A., Gardana, G., Rizzolo, D., Simonetti, M., Porrini. (2012). Blanching improves anthocyanin absorption from highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) purée in healthy human volunteers: A pilot study. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **60**(36): 9298-9304.
- Dragovic-Uzelac, Verica, Savic, Zvonimir, Brala, Ana, Levaj, Branka, Kovacevic, Danijela Bursac, & Bisko, Ante. (2010). Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity of blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in the Northwest Croatia. *Food Technology and Biotechnology* **48**(2): 214.
- Galleta, G. J. & Ballington, J. R. "Blueberries, cranberries, and lingonberries (1996) In: Jules Janick and James Moore (eds) *Fruit Breeding*, vol II. *Vine and Small Fruits*. John Wiley and Sons, New Youk, USA: 1-107.
- He, Y., Zhou, F., Shen, Y., Liao, D., & Cao, D. (2014). Apoptotic death of cancer stem cells for cancer therapy. *International Journal of Molecular Sciences* **15**(5): 8335-8351.
- Huang, Z., Wang, B., Eaves, D. H., Shikany, J. M., & Pace, R. D. (2007). Phenolic compound profile of selected vegetables frequently consumed by African Americans in the southeast United States. *Food Chemistry* **103**: 1395–1402.

- Kader, F., Rovel, B., Girardin, M., & Metche. (1996). Fractionation and identification of the phenolic compounds of Highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum*, L.). *Food Chemistry* **55**(1): 35-40.
- Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, M., & Kobori. (2003). Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the anthocyanins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**(1): 68-75.
- Monks, A., Scudiero, D., Skehan, P., Shoemaker, R., Paull, K., Vistica, D., Hose, C., Langley, J., Cronise, P., Vaigro-Wolff, A., et al.,(1991). Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**: 757-766.
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* **65**(1-2): 55-63.
- Müller, D., Schantz, M., & Richling, E. (2012). High Performance Liquid Chromatography Analysis of Anthocyanins in Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), and Corresponding Juices. *Journal of Food Science* **77**(4): C340-C345.
- Nguyen, V., Tang, J., Oroudjev, E., Lee, C., Marasigan, C., Wilson, L., & Ayoub, G. (2010). Cytotoxic Effects of Bilberry Extract on MCF7-GFP-Tubulin Breast Cancer Cells. *Journal of Medicinal Food* **13**(2): 278-285.
- Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Jacques, A. C., Vizzotto, M., Godoy, H. T., & Zambiazi, R. C. (2012). Quantification of several bioactive compounds and antioxidant activities of six cultivars of brazilian blueberry.
- Seeram, N. P., L. S. Adams, Y. Zhang, R. Lee, D. Sand, H. S. Scheuller and D. Heber (2006). Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro. *J Agric Food Chem* **54**(25): 9329-9339.
- Skupien, K., J. Oszmianski, D. Kostrzewska-Nowak and J. Tarasiuk (2006). In vitro antileukaemic activity of extracts from berry plant leaves against sensitive and multidrug resistant HL60 cells. *Cancer Lett* **236**(2): 282-291.
- Srivastava, A., Akoh, C., Fischer, J., & Krewer, G. (2007). Effect of anthocyanin fractions from selected cultivars of georgia-grown blueberries on apoptosis and phase II enzymes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**(8): 3180-3185.
- Yi, W., Fischer, J., Krewer, G., & Akoh, C. (2005). Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**(18): 7320-7329

Zhao, C., M. M. Giusti, M. Malik, M. P. Moyer and B. A. Magnuson (2004). Effects of commercial anthocyanin-rich extracts on colonic cancer and nontumorigenic colonic cell growth. J Agric Food Chem **52**(20): 6122-6128.

5. DISCUSSÃO GERAL

O uso de espécies vegetais no tratamento e cura de enfermidades é tão antigo quanto a espécie humana. O conhecimento da utilidade sobre plantas medicinais simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos (BRASIL, Resolução nº 08 de 08 de março de 1988, 1988). Substâncias extraídas a partir dos frutos da cultivar Misty podem ser consideradas como potenciais agentes antitumorais devido ao grande número de estudos já realizados que comprovam a associação entre mirtilo e a promoção da saúde (Pertuzatti et al. 2012; Souza et al. 2014).

Preparados a partir de extratos de mirtilos possuem diversas atividades já documentadas, como por exemplo, propriedades antioxidantes, antiinflamatórias, cardioprotetores, hipoglicêmicos, antiobesidade, que proporcionam efeitos benéficos à saúde (DeFuria et al. 2009; Meydani & Hasan 2010; Kim et al. 2013; Roopchand et al. 2013; Pertuzatti et al. 2014). Muitas destas atividades resultam do elevado teor em compostos fenólicos que estes frutos possuem, devido em grande parte a presença das antocianinas e dos flavonóides (Del Bo' et al. 2012).

No Capítulo I, com a identificação dos compostos através de HPLC-MS revelou-se nos extratos hidroalcóolicos ExtSB e ExtWB de *Vaccinium corymbosum* (L.) a presença de elevado conteúdo de antocianinas, incluindo delphinidinas, cianidinas, malvidinas, petunidinas e peonidinas. As antocianinas estão relacionadas com a atividade biológica do mirtilo, sendo que a atividade citotóxica pode estar vinculada a presença deste grupo de substâncias. Estudo desenvolvido por Yi et al. (2005) verificaram a atividade citotóxica de quatro frações de extratos obtidos a partir de mirtilo (fração de ácidos fenólicos, flavonóides, procianidinas e antocianinas) em

células HT-29 e Caco-2 de câncer de cólon, com IC₅₀ variando de 1000 µg.mL⁻¹ (fração de antocianinas) até 3000 µg.mL⁻¹ (fração de ácido fenólicos) em 24 horas de tratamento.

Evidenciou-se através do presente estudo, conforme Capítulo I, por meio da avaliação da atividade do extrato hidroalcóolico obtido a partir de diferentes partes do fruto do mirtilo (casca (ExtSB), polpa (ExtPB), fruto inteiro (ExtWB), que as antocianinas concentram-se na casca do fruto, uma vez que somente foram encontradas estas substâncias nos extratos ExtWB e ExtSB. A presença de antocianinas desenvolve uma coloração escura à casca do fruto, que está associada principalmente à proteção contra agentes externos (Triebel et al. 2012). Já no extrato da polpa do fruto, ExtPB, foram identificados compostos polifenólicos como ácido clorogênico, quercitinas e proantocianidinas que também apresentam importantes atividades biológicas (Liu et al. 2011; Johnson et al. 2013; Esposito et al. 2014). Os compostos presentes na polpa do mirtilo e identificados através do extrato ExtPB parecem estar associados à atividade citotóxica de forma determinante, contribuindo com a atividade citotóxica apresentada pelo extrato do fruto inteiro, ExtWB, uma vez que este extrato apresentou o maior poder inibitório sobre células tumorais. Nos extratos hidroalcólicos de mirtilo, utilizando ExtSB, ExtWB e ExtPB, com linhagens tumorais HeLa, Hep-2 e HT-29, observou-se uma variação de IC₅₀ de 474 µg.mL⁻¹ até 2.052 µg.mL⁻¹, dependente da linhagem tumoral e do tipo de extrato utilizado (Capítulo I, Tabela 3). Os resultados aqui apresentados indicam a importância do sinergismo dos compostos presentes no fruto inteiro (ExtWB), preterível até mesmo em relação aos extratos da casca (ExtSB) isoladamente.

A maior atividade citotóxica dada possivelmente pelo sinergismo dos compostos foi verificada também por Olsson et al. (2004), onde a fração do extrato utilizada contra

células HT-29 (cancer de cólon) e MCF-7 (câncer de mama) que continha ácidos hidroxicinâmicos, antocianinas e outros compostos fenólicos, apresentou poder inibitório maior do que a fração que continha apenas antocianinas. As proantocianidinas têm demonstrado atividade antitumoral promissora, como verificado em estudo realizado por Schmidt et al. (2006), em que foram testadas linhagens tumorais da próstata, LNCaP e DU145, com frações ricas em proantocianidinas (fração 4 e 5) extraídas de mirtilos. As células foram mantidas em contato com os extratos por 48 e 72 horas. Neste estudo, a fração 4 apresentou IC₅₀ de 22,7 µg.mL⁻¹ e a fração 5 IC₅₀ de 5,8 µg.mL⁻¹ para LNCaP e, para DU145, a atividade inibitória encontrada com a fração 4 foi de 74,4 µg.mL⁻¹.

Tanto no Capítulo I (Tabela 3) como no II (Tabela 2) as células tumorais apresentaram IC₅₀ inferior a linhagem não tumoral utilizada, sugerindo seletividade dos compostos para células tumorais. Para linhagem não tumoral estudada, MRC-5, no Capítulo I deste trabalho, a concentração de inibição de 50% das células não tumorais não foi obtida até 5.000 µg.mL⁻¹. Adams et al. (2010) verificaram a atividade citotóxica de extrato metanólico de mirtilo em 72 horas de incubação com linhagem de células HCC38 (câncer de mama) e MCF-10A (linhagem não tumoral). O IC₅₀ para a linhagem tumoral foi de aproximadamente 50 µg.mL⁻¹, enquanto que até uma concentração de 100 µg.mL⁻¹ o extrato não inibiu a linhagem não tumoral MCF-10A.

No Capítulo II utilizou-se extração metanólica acidificada, a fim de se favorecer a extração de antocianinas e optou-se por extração apenas do fruto inteiro, já que o extrato ExtWB apresentou melhor atividade citotóxica no Capítulo I. Ao analisar os compostos por HPLC-MS, os resultados não indicaram diferença qualitativa dos compostos identificados na anteriormente na extração etanólica prévia, apresentada no Capítulo I. Obteve-se um IC₅₀ inferior nas células mantidas em contato com o extrato

ExtMB, porém o fator tempo de contato é importante como variável para os resultados apresentados no Capítulo II. O tempo de incubação das células com extrato passou de 24 horas (Capítulo I) para 72 horas (Capítulo II), apresentando uma considerável diminuição nas concentrações necessárias de extrato para inibir 50% das células tumorais, em que a variação de IC₅₀ para as mesmas linhagens tumorais incubadas a 72 horas foi de 248,29 até 305,25 µg.mL⁻¹ em contraste a 474 µg.mL⁻¹ até 880 µg.mL⁻¹ para 24 horas de incubação.

Os achados deste estudo, com utilização de extração metanólica e tempo de 72 horas, corroboram os dados encontrados por Kausar et al. (2012) desenvolvidos na Índia, que utilizou uma mistura de antocianinas (cianidinas, malvidinas, peonidinas, petunidinas e delfinidinas) isoladas de extratos obtidos de mirtilo, amora e framboesa, e verificaram através de teste MTT, a presença de atividade citotóxica e seletividade para células tumorais. Este estudo observou IC₅₀ de 35 µM e 80 µM nas linhagens H1299 e A549 de tumor de não pequenas células, enquanto que o crescimento da linhagem não tumoral Beas2b (células do epitélio brônquico), não foi afetado, após 72 horas de incubação. Zu et al. (2010) verificaram a atividade citotóxica de antocianinias isoladas de mirtilo, com um extrato que continha 40,70% de delfinidinas, 3,40 % de cianidinas, 17,70% de petunidinas, 2,90% de peonidinas e 35,50% de malvidinas, com linhagem de câncer de colon e colorectal (DLD-1 e COLO205), obtendo-se um IC₅₀ de 50 µg.mL⁻¹ em ambas as linhagens.

Deste modo, ocorre analogia aos Capítulo I e II, onde evidencia-se que diferentes extratos de mirtilo podem influenciar e reduzir sensivelmente o valor de IC₅₀, apresentando relação entre viabilidade celular e tempo de exposição. Assim, observou-se, no Capítulo I, que as extrações realizadas com diferentes partes do fruto (casca,

polpa e fruto inteiro) influenciam na atividade citotóxica em células tumorais, com modificações nos compostos presentes em cada extrato. É de conhecimento a grande diversidade nas variedades de mirtilos, com modificações na quantidade de compostos devido a cultivar estudada, bem como o clima, local de cultivo e práticas agrícolas (Pertuzatti et al. 2014). Estes fatores influenciam direta ou indiretamente no tipo e quantidade de compostos que apresentam atividade biológica e, consequentemente, geram diferenças na citotoxicidade observada entre os nossos estudos e aqueles reportados na literatura.

Em acréscimo, neste trabalho, procurou-se observar as alterações morfológicas, através de coloração de Giemsa com auxílio de microscopia. A linhagem tumoral (HT-29) tratada com extrato ExtWB de mirtilo, na concentração do IC₅₀ apresentou modificações em sua morfologia e número reduzido de células (Capítulo I, Figura 5). Já no controle, as células apresentaram aspecto morfológico arredondado e íntegro, assim como para a linhagem não tumoral (MRC-5) na concentração de 5.000 µg.mL⁻¹, evidenciou-se poucas alterações morfológicas nas células.

Além de avaliar a viabilidade celular e alterações morfológicas, a fim de elucidar a citotoxicidade dos extratos obtidos a partir da dos frutos de mirtilo da cultivar Misty, nos Capítulo I e II, investigou-se os mecanismos de resposta a morte celular programada nas células expostas aos extratos. No Capítulo I (Figuras 4 e 5) verificou-se as alterações celulares geradas após contato com o extrato ExtWB na linhagem tumoral HT-29, que apresentou melhor perfil inibitório e, na linhagem não tumoral MRC-5, a fim de evidenciar-se a seletividade celular. Através da coloração com brometo de etídio/laranja de acridina, observou-se maior número de células em apoptose tardia e necrose na linhagem HT-29 comparada com a linhagem não tumoral MRC-5.

No Capítulo II (Figuras 2 e 3), o perfil manteve-se, mesmo modificando o desenho experimental no que se refere ao tempo de incubação e forma de extração aprimorada para antocianidinas. O segundo estudo evidenciou que o número de células em apoptose tardia e necrose obteve um incremento, tanto para linhagem não tumoral como para as linhagens tumorais investigadas, em relação aos dados obtidos no Capítulo I. A identificação de alterações nucleares (núcleos fragmentados, bolhas na membrana nuclear, com a formação de manchas amarelo-laranja, ou núcleo totalmente corado de vermelho) caracterizam células em apoptose tardia e necrose. As alterações na membrana nuclear provocadas pelo contato com o extrato de mirtilo (ExtWB e ExtMB) permitem a penetração do brometo de etídio, corando o núcleo e seus fragmentos de vermelho nas células em apoptose tardia e necrose, indicando a distinção com as células viáveis, que apresentam núcleos íntegros, e com as células em apoptose inicial, com coram seus núcleos de verde, porém, nas células em apoptose inicial verifica-se a presença de fragmentação do DNA e de corpos apoptóticos. A visualização dessas alterações somente se dá através da sobreposição das imagens como parâmetro para avaliar eventos de apoptose inicial, apoptose tardia e necrose.

Neste contexto, os resultados gerados nos estudos descritos, tanto no Capítulo I como no Capítulo II em relação a apoptose, estão em conformidade com os descritos por Boivin et al. (2007), que constataram que extrato aquoso de uma mistura de várias bagas, incluindo framboesa, groselha preta e branca, mirtilo, morango, amora e *cranberry* é capaz de induzir a parada do ciclo celular, ativando a cascata bioquímica da apoptose, em células de carcinoma de estômago, próstata, cólon e mama. Dados também verificados por Srivastava et al. (2007), onde extratos de cultivares de mirtilo, obtidos por extração com uma mistura de acetona, metanol, ácido fórmico e água foram

capazes de suprimir o crescimento de linhagem tumoral HT-29 e induzir a apoptose com efeito significativo na expressão da atividade da caspase-3. Dessa forma, uma investigação mais detalhada das vias envolvidas no processo de apoptose, verificada neste trabalho, faz-se necessária.

Com o uso de diferentes metodologias de extração dos compostos presentes no mirtilo e avaliação da atividade citotóxica em diferentes períodos de tempo, buscou-se a melhor metodologia de extração de compostos que possoam agir na inibição do crescimento de células tumorais. A extração metanólica, com uso do fruto inteiro, associado ao maior tempo incubação do extrato (72 horas), favoreceu a citotoxicidade dos modelos tumorais *in vitro* investigados. As alterações metodológicas propostas no Capítulo II indicam uma melhor atuação biológica dos extratos, porém a caracterização química desenvolvida para este estudo não permite avaliar a concentração dos compostos extraídos. São necessário estudos adicionais com técnicas quantitativas de extração e análise, para comprovação da concentração dos compostos identificados nas induções citotóxicas do Capítulo II.

É de conhecimento que muitos agentes terapêuticos disponíveis para o tratamento do câncer tem seu mecanismo de atuação em modelos tumorais através da indução da morte celular por apoptose, tornando-se estratégicas terapêuticas alternativas para controle da progressão dos tumores (Mester & Redeuilh, 2008; Tan et al. 2009; Hanahan e Weinberg, 2011). Os estudos com extratos do mirtilo demonstram importantes atividades citotóxicas e indução da via apoptótica que podem colaborar na elucidação de muitos dos processos que envolvem as vias de morte celular. Assim, pesquisas como as realizadas neste estudo possuem benefícios esperados, que caracterizam uma demanda quanto a necessidade do desenvolvimento de novas

estratégias para o tratamento do câncer, com atuação celular seletiva e, consequentemente, menor toxicidade para o paciente tratado.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste trabalho permitem concluir que:

- ✓ Revelou-se na caracterização química por ESI-QTOF MS/MS dos extratos hidroalcólico de casca e fruto inteiro (ExtSB e ExtWB) e metanólico do fruto inteiro (ExtMB) a presença de antocianinas e compostos polifenólicos tais como: delfinidinas, cianidinas, petunidinas; peonidinas; ácido clorogênico, quercitinas, proantocianidinas, laricitrina, siringetina.
- ✓ No extrato hidroalcólico da polpa (ExtPB) evidenciou-se somente a presença dos compostos polifenólicos como: ácido clorogênico, quercitinas, proantocianidinas, laricitrina, siringetina.
- ✓ Os extratos hidroalcólico e metanólico de mirtilo da cultivar Misty (*Southern Highbush*) são capazes de inibir o crescimento de células tumorais de carcinoma de laringe humano (Hep-2), adenocarcinoma de cérvix humano (HeLa), adenocarcinoma de cólon (HT-29).
- ✓ Os extratos apresentaram seletividade para linhagem tumorais em comparação a linhagem não tumoral (MRC-5).
- ✓ O uso de diferentes metodologias de extração dos compostos, bem como a alteração do tempo de incubação com as células tumorais influencia nos parâmetros de citotoxicidade e indução de apoptose.
- ✓ Os extratos hidroalcólicos e metanólico apresentaram melhor concentração inibitória para a linhagem HT-29, que para as linhagens HeLa, HT-29 e MRC-5, quando em contato com extrato obtido a partir do fruto inteiro.

- ✓ Melhores resultados de concentração inibitória para as linhagens tumorais testadas HT-29, HeLa e Hep-2 foram obtidos com tempo de exposição de 72 horas em contato com extrato metanólico do fruto inteiro.
- ✓ Os extratos de mirtilo da cultivar Misty (*Southern Highbush*) induziram eventos de apoptose tardia e necrose em células tumorais tratadas com ExtMB em relação ao grupo controle de células que não receberam tratamento. O mesmo foi observado para células não tumorais, porém em menores proporções, em que evidenciou-se maior número de células viáveis e em apoptose inicial.

7. PERSPECTIVAS

Como continuidade deste estudo seria importante:

- ✓ Avaliar por meio de extração quantitativa os compostos presentes em cada um dos extratos;
- ✓ Realizar o fracionamento químico dos extratos de mirtilo da cultivar Misty (*Southern Highbush*);
- ✓ Avaliar a citotoxicidade dos extratos com outras linhagens tumorais e não tumorais;
- ✓ Avaliar a expressão de proteínas envolvidas na apoptose e diferencialmente expressas através de Western blot;
- ✓ Avaliar a expressão de marcadores do ciclo celular, apoptose celular e proliferação celular através de imunocitoquímica;
- ✓ Avaliar danos ao DNA utilizando ensaios genotóxicos através do teste cometa;
- ✓ Utilizar protômica comparativa através de técnicas de eletroforese bidimensional e gel-free.
- ✓ Avaliar a citotoxicidade do mirtilo em estudos *in vivo*;
- ✓ Realizar estudo comparativo com outras espécies e/ou cultivares de mirtilo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, L. S., Phung, S., Yee, N., Seeram, N. P., Li, L., Chen, S. (2010). "Blueberry Phytochemicals Inhibit Growth and Metastatic Potential of MDA-MB-231 Breast Cancer Cells Through Modulation of the Phosphatidylinositol 3-Kinase Pathway". *Cancer Res.* **70**(9):3594-3605.
- Antunes, L. E. C., Gonçalves, E. D., Ristow, N. C., Carpenedo, S., Trevisan, R. (2008). Fenologia, produção e qualidade dos frutos de mirtilo. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* **43**(8): 1011-1015.
- Belitz, H.; Grosch, W. Química de los Alimentos. Zaragoza: Ed. Acribia, Espanha, 1997.
- Boivin, D., Blanchette, M., Barrette, S., Moghrabi, A., Beliveau, R. (2007). "Inhibition of cancer cell proliferation and suppression of TNF-induced activation of NF κ B by Edible Berry Juice". *Anticancer Research* **27**:937-948.
- Bracke, M. E., B. W. Vanhoecke, L. Derycke, S. Bolca, S. Possemiers, A. Heyerick, C. V. Stevens, D. De Keukeleire, H. T. Depypere, W. Verstraete, C. A. Williams, S. T. McKenna, S. Tomar, D. Sharma, A. K. Prasad, A. L. DePass and V. S. Parmar (2008). "Plant polyphenolics as anti-invasive cancer agents." *Anticancer Agents Med Chem* **8**(2): 171-185.
- BRASIL. Resolução n. 08 de 08 de março de 1988. Implantar a prática de Fitoterapia nos Serviços de Saúde, assim como orientar, através das Comissões Interinstitucionais de Saúde (CIS), buscarem a inclusão da Fitoterapia nas Ações Integradas de Saúde (AIS), e/ou programação do Sistema Unificado e Descentralizado de Saúde (SUDS), nas Unidades Federadas, visando colaborar com a prática oficial da medicina moderna, em caráter complementar. In.: BRASIL, Resolução 08 de março de 1988.
- Bremer, V., Crisosto, G., Molinar, R., Jimenez, M., Dollahite, S., Crisosto, H. (2008). "San Joaquin Valley blueberries evaluated for quality attributes." *California Agriculture* **62**(3):91-96.
- Brody, H. (2014) "Cancer" *Nature Outlook* **509**(7502): S49.
- Bunea, A., D. Rugina, Z. Sconta, R. M. Pop, A. Pintea, C. Socaciu, F. Tabaran, C. Grootaert, K. Struijs and J. VanCamp (2013). "Anthocyanin determination in blueberry extracts from various cultivars and their antiproliferative and apoptotic properties in B16-F10 metastatic murine melanoma cells." *Phytochemistry* **95**: 436-444.
- Christodoulou, M. I., Kontos, C. K., et al. (2013). "Nature Promises New Anticancer Agents: Interplay with the Apoptosis-related BCL2 Gene Family." *Anticancer Agents Med Chem*.

- Cragg, G. M., Newman, D. J., (2005). "Plants as a source of anti-cancer agents". Journal of Ethnopharmacology **100**: 72-79.
- Debatin, K. M. (2004). "Apoptosis pathways in cancer and cancer therapy". Cancer Immunol Immunother. **53**: 153-159.
- DeFuria, J., G. Bennett, K. J. Strissel, J. W. Perfield, 2nd, P. E. Milbury, A. S. Greenberg and M. S. Obin (2009). "Dietary blueberry attenuates whole-body insulin resistance in high fat-fed mice by reducing adipocyte death and its inflammatory sequelae." J Nutr **139**(8): 1510-1516.
- Degterev, A., M. Boyce, Yuan, J. (2003). "A decade of caspases" Oncogene **22**:8543-8567.
- Del Bo', C., Riso, P., Brambilla, A., Gardana, G., Rizzolo, D., Simonetti, M., Porrini. (2012). "Blanching improves anthocyanin absorption from highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) purée in healthy human volunteers: A pilot study". Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**(36): 9298-9304.
- Djeradi, H., Rahmouni, A., Cheriti, A. (2014) "Antioxidant activity of flavonoids: a QSAR modeling using Fukui indices descriptors" J Mol Model **20**:2076.
- Dragovic-Uzelac, V., Z. Savic, A. Brala, B. Levaj, D. B., Kovacevic, A. Bisko. (2010). "Evaluation of phenolic content and antioxidant capacity of blueberry cultivars (*Vaccinium corymbosum* L.) grown in the northwest Croatia" Food Technol Biotechnol **48**(2): 214-221.
- Duarte, R. A. (2010). Sinalização celular para apoptose em linhagem celular de adenocarcinoma (MCF-7) e carcinoma ductal invasivo de mama (ZR 7531) tratados com alcaloides isolados de *Pterogyne nitens*. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista Júlio Mesquita.
- Dunn, B. (2012). "Cancer: Solving an age-old problem." Nature **483**: 2-6.
- Elmore, S. (2007). "Apoptosis: A review of programmed cell death". Toxicol Pathol **35**(4): 495-516
- Esposito, D., Chen, A., Grace, M., Komarnytsky, S., & Lila, M. (2014). Inhibitory effects of wild blueberry anthocyanins and other flavonoids on biomarkers of acute and chronic inflammation in vitro. Journal of Agricultural and Food Chemistry **62**(29): 7022-7028.
- Faria, A., Pestana, D., Teixeira, D., Freitas, V., Mateus, N., Calhau, C. (2010). "Blueberry anthocyanins and pyruvic acid addcts: anticâncer properties in breast câncer cell lines" Phytoter Res **24**:1862-1869.
- Fennema, O. R. Food Chemistry. Third Edition. Marcel Dekker, Inc. New York, 1997.

Fonseca, L. L. & Oliveira, P. B. (2007). A planta de mirtilo: Morfologia e fisiologia.

Divulgação AGRO **556**(2): 1-24.

Formagio, A.S.N., Vieira, M.C., Santos, L.A.C., Cardoso, C.A.L., Foglio, M.A., Carvalho, J.E., Silva, M.A., Kassuya, C. (2013) "Composition and Evaluation of the Anti-Inflammatory and Anticancer Activities of the Essential Oil from Annona syllatica A. St. –Hil". J. Med. Food **16**:1:20-25.

Fridman, J. S. & S. W. Lowe (2003). "Control of apoptosis by p53". Oncogene **22**(56): 9030-9040.

Galleta, G. J. & Ballington, J. R. "Blueberries, cranberries, and lingonberries (1996) In: Jules Janick and James Moore (eds) Fruit Breeding, vol II. Vine and Small Fruits. John Wiley and Sons, New Youk, USA: 1-107.

Galluzzi, L., O. Kepp, S. Krautwald, G. Kroemer and A. Linkermann (2014). "Molecular mechanisms of regulated necrosis." Semin Cell Dev Biol.

Gavrilova, V., M. Kajdzanoska, V. Gjamovski and M. Stefova (2011). "Separation, characterization and quantification of phenolic compounds in blueberries and red and black currants by HPLC-DAD-ESI-MSn." J Agric Food Chem **59**(8): 4009-4018.

Giovanelli, G. & Buratti, S. (2009). "Comparison of polyphenolic composition and antioxidant activity of wild Italian blueberries and some cultivated varieties." Food Chemistry **112**: 903-908.

Grace, M. H., Ribnicky, D. M., Peter, K. (2009). "Hypoglycemic activity of a novel anthocyanin-rich formulation from lowbush blueberry, Vaccinium angustifolium Aiton." Phytomedicine **16**: 406-415.

Hail, N., Jr., B. Z. Carter, M. Konopleva and M. Andreeff (2006). "Apoptosis effector mechanisms: a requiem performed in different keys". Apoptosis **11**(6): 889-904.

Hajra, K. M. and J. R. Liu (2004). "Apoptosome dysfunction in human cancer." Apoptosis **9**(6): 691-704.

Hanahan, D., Weinberg, R., (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation". Cell. Elsevier Inc. **144**(5):646–74.

INCA (2011) Instituto nacional do Câncer. ABC do Câncer - Abordagens básicas para o controle do câncer. Disponível *on line* em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/abc_do_cancer.pdf. Acesso em 15 mai. 2014. 2011 ed. Rio de Janeiro. 128p.

INCA (2014) Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2015: Incidência de Câncer no Brasil.

Jemal, A., F. Bray, M. M. Center, J. Ferlay, E. Ward and D. Forman (2011). "Global cancer statistics." CA Cancer J Clin **61**(2): 69-90.

Johnson, S. A. & Arjamandi, B. H. (2013). "Evidence for anti-cancer properties of blueberries: a mini-review". Anticancer Agents Med Chem **13**(8): 1141-1148.

Jouan-Lanhouet, S., F. Riquet, L. Duprez, T. Vanden Berghe, N. Takahashi and P. Vandenabeele (2014). "Necroptosis, in vivo detection in experimental disease models." Semin Cell Dev Biol.

Katsube, N., Iwashita, K., Tsushida, T., Yamaki, K., Kobori, M. (2003). "Induction of apoptosis in cancer cells by bilberry (*Vaccinium myrtilllys*) and the Anthocyanins". Journal of Agricultural and Food Chemistry **51**:68-75

Kausar, H., Jeyabalan, J., Aqil, F., Chabba, D., Sidana, I., Singh, R., & Gupta. (2012). Berry anthocyanidins synergistically suppress growth and invasive potential of human non-small-cell lung cancer cells. Cancer Letters **325**(1): 54-62.

Kheirollahi, A., M. Pordeli, M. Safavi, S. Mashkouri, M. R. Naimi-Jamal and S. K. Ardestani (2014). "Cytotoxic and apoptotic effects of synthetic benzochromene derivatives on human cancer cell lines." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.

Kim, J. G., Kim, H.L., Kim, J. S., Park, S. K. (2013). "Fruit quality, anthocyanin and total phenolic contents, and antioxidant activities of 45 blueberry cultivars grown in Suwon, Korea". Biomed & Biotechonol **14**(9): 793-799.

Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S.M., Binkoski, A.E., Hilpert, K. F., Griel, A. E., Etherton T.D., (2002). "Bioactive compounds in foods: Their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer". The American Journal of Medicine. **113**(9B): 71S-88B.

Kumar, R.; Han, J.; Lim, H.; Ren, W. X.; Lim, J. Y.; Kim, J.; Kim, J. S. (2014). "Mitochondrial Induced and Self-Monitored Intrinsic Apoptosis by Antitumor Theranostic Prodrug: In Vivo Imaging and Precise Cancer Treatment". Journal of the American Chemical Society.

Lee, C. M., Su, Y. H., Huynh, T. T. et al. (2013). "Blueberry isolate, pterostilbene, functions as a potential anticancer stem cell agent in suppressing irradiation-mediated enrichment of hepatoma stem cells." Hindawi Publis Corporat. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2013/258425>.

Lee, S., Jung, E. S., Do, S. G., Jung, G. Y., Song, G., Song, J. M., Lee, C. H. (2014). "Correlation between species-specific metabolite profiles and bioactivities of blueberries (*Vaccinium* spp.)". J Agric Food Chem.

Lyrne, P. M. & J. G. Williamson. (1997). "Highbush blueberry varieties for Florida." Proceeding of the Florida State Horticultural Society **110**: 171-174.

- Lima, E. M. et al. (2005) Drifter Technique: a New Method to Obtain Metaphases in Hep-2 Cell Line Cultures. Brazilian Archives of Biology and Technology. **(48)**:537-540.
- Lima, A. J. B., Corrêa, A. D., Saczk, A. A., Martins, A. P., Castilho, R. O. (2011). "Anthocyanins, pigment stability and antioxidant activity jabuticaba". Rev Bras Frutic Jaboticabal **(33)**: 877-887.
- Linkermann, A. and D. R. Green (2014). "Necroptosis." N Engl J Med **370**(5): 455-465.
- Liu, J., Zhang, W., Jing, H., Popovich, D. (2010). "Bog Bilberry (*Vaccinium uliginosum* L.) extract reduces cultured Hep-G2, Caco-2, and 3T3-L1 cell viability, affects cell cycle progression, and has variable effects on membrane permeability." J of Food Science **75**(3).
- Liu, Y., Wang, D., Zhang, W., Lv, F., Wei, M., Wu, T. Ji. (2011). Inhibitory effect of blueberry polyphenolic compounds on oleic acid-induced hepatic steatosis in vitro. Journal of Agricultural and Food Chemistry **59**(22):12254-12263.
- Lopera, Y. E., J. Fantinelli, L. F. Gonzalez Arbelaez, B. Rojano, J. L. Rios, G. Schinella and S. Mosca (2013). "Antioxidant Activity and Cardioprotective Effect of a Nonalcoholic Extract of *Vaccinium meridionale* Swartz during Ischemia-Reperfusion in Rats." Evid Based Complement Alternat Med **(2013)**: 516727.
- Manganaris, G. A., V. Goulas, A. R. Vicente and L. A. Terry (2014). "Berry antioxidants: small fruits providing large benefits." J Sci Food Agric **94**(5): 825-833.
- Março, P. H. & R. J. Poppi (2008). Procedimentos analíticos para identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. Quim. Nova **31**(5):1218-1223.
- Martin, S. J. & C. M. Henry (2013). "Distinguishing between apoptosis, necrosis, necroptosis and other cell death modalities." Methods **61**(2):87-89.
- Martineau, L. C., Couture, A., Spoor, D., et al. (2006). "Anti-diabetic properties of the Canadian lowbush blueberry *Vaccinium angustifolium* Ait." Phytomedicine **13**: 612-623.
- McHugh, P. and M. Turina (2006). "Apoptosis and necrosis: a review for surgeons." Surg Infect (Larchmt) **7**(1): 53-68.
- Mester, J., Redeuilh, G. (2008). "Proliferation of breast cancer cells: regulation, mediators, targets for therapy". Anticancer Agents Med Chem, **8**: 872-885.
- Meydani, M. & S. T. Hasan (2010). "Dietary polyphenols and obesity." Nutrients **2**(7): 737-751.
- Naczk, M. and F. Shahidi (2004). "Extraction and analysis of phenolics in food." J Chromatogr A **1054**(1-2): 95-111.

Newmann, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M. (2003). "Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002." Journal of Natural Products **66**: 1022-1037.

Nguyen, V., Tang, J., Oroudjev, E., Lee, C., Marasigan, C., Wilson, L., & Ayoub, G. (2010). Cytotoxic effects of bilberry extract on MCF7-GFP-tubulin breast cancer cells. Journal of Medicinal Food **13**(2): 278-85.

Nicoue, E. E., S. Savard and K. Belkacemi (2007). "Anthocyanins in wild blueberries of Quebec: extraction and identification." J Agric Food Chem **55**(14): 5626-5635.

Nobili, S., D. Lippi, E. Witort, M. Donnini, L. Bausi, E. Mini and S. Capaccioli (2009). "Natural compounds for cancer treatment and prevention." Pharmacol Res **59**(6): 365-378.

Nyberg, S., Gerring, E., Gjellan, S., Vergara, M., Lindström, T., Nystrom, F. (2013). "Effects of exercise with or without blueberries in the diet on cardio-metabolic risk factors: An exploratory pilot study in healthy subjects." Upsala Journal of Medical Sciences **118**: 247-255.

Olsson, M. E., Gustavsson, K. E., Andersson, S., Nilsson, A., Doan, R. D. (2004). Inhibition of cancer cell proliferation in vitro by fruit and berry extracts and correlations with antioxidant levels." J Agric Food Chem **52**: 7264-7271.

Ovando, A. C., Hernández, M. L. P., Hernández, M. E. P., Rodríguez, J. A., Vidal, C. A. G. (2009). "Chemical studies of anthocyanins: A review." Food Chemistry **113**: 859-871.

Pagot, E. (2006). Cultivo de pequenas frutas: amora-preta, framboesa, mirtilo. EMATER/RS-ASCAR. Porto Alegre, 41p.

Parkin, D. M. (2006). "The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002" Int J Cancer **118**: 3030-3044.

Pertuzatti, P. B., M. T. Barcia, D. Rodrigues, P. N. da Cruz, I. Hermosin-Gutierrez, R. Smith and H. T. Godoy (2014). "Antioxidant activity of hydrophilic and lipophilic extracts of Brazilian blueberries." Food Chem **164**: 81-88.

Prior, R. L., S. A. Lazarus, G. Cao, H. Muccitelli and J. F. Hammerstone (2001). "Identification of procyandins and anthocyanins in blueberries and cranberries (*Vaccinium* spp.) using high-performance liquid chromatography/mass spectrometry." J Agric Food Chem **49**(3): 1270-1276.

Raseira, M. C. B & Antunes, L. E. C. (2004). A cultura do mirtilo Embrapa Clima Temperado. 67p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 121).

Reque, P. M., Steffens, R. S., Jablonski, A., Flôres, S. H., Rios, A. O., Jong, E. V. (2014). "Cold storage of blueberry (*Vaccinium* spp.) fruits and juice: Anthocyanin stability and antioxidant activity." Journal of Food Composition and Analysis **33**: 111-116.

- Rodriguez-Mateos, A., T. Cifuentes-Gomez, S. Tabatabaei, C. Lecras and J. P. Spencer (2012). "Procyanidin, anthocyanin, and chlorogenic acid contents of highbush and lowbush blueberries." *J Agric Food Chem* **60**(23): 5772-5778.
- Roopchand, D. E., P. Kuhn, L. E. Rojo, M. A. Lila and I. Raskin (2013). "Blueberry polyphenol-enriched soybean flour reduces hyperglycemia, body weight gain and serum cholesterol in mice." *Pharmacol Res* **68**(1): 59-67.
- Schleich, K. and I. N. Lavrik (2013). "Mathematical modeling of apoptosis." *Cell Commun Signal* **11**(1): 44.
- Schmidt, B., Erdman Jr., J., & Lila, M. (2006). "Differential effects of blueberry proanthocyanidins on androgen sensitive and insensitive human prostate cancer cell lines". *Cancer Letters* **231**(2), 240-246.
- Schnettler, B., H. Miranda, J. Sepulveda, M. Denegri, M. Mora and G. Lobos (2011). "Preferences for berries among consumers in southern Chile: blueberries are produced but are they consumed?" *J Food Sci* **76**(7): S458-464.
- Seeram, N. P., L. S. Adams, Y. Zhang, R. Lee, D. Sand, H. S. Scheuller and D. Heber (2006). "Blackberry, black raspberry, blueberry, cranberry, red raspberry, and strawberry extracts inhibit growth and stimulate apoptosis of human cancer cells in vitro." *J Agric Food Chem* **54**(25): 9329-9339.
- Seito, L.N., Ruiz, A.L.T.G., Costa, V. D., Tinti, S.V., Carvalho, J.E., Bastos, J.K., Stasi, L.C.D. (2011) "Antiproliferative activity of three methoxylated flavonoids isolated from Zeyheria montana Mart. (Bignoniaceae) Leaves". *Phytotherapy Research* **25**:1447-1450.
- Skrede, G., Wrolstad, R. E., Durst, R. W. (2000). "Changes in Anthocyanins and Polyphenolics during juice processing of highbush blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.)". *Journal of Food Science* **65**(2): 357-364.
- Skupien, K., Oszmianski, J., Kostrzewska-Nowak, D., Tarasiuk, J. (2006). "In vitro antileukaemic activity of extracts from berry plant leaves against sensitive and multidrug resistant HL 60 cells." *Cancer Letters* **236**: 282-291.
- Silva, M. R.; Silva, M. A. A. P. (1999). Aspectos nutricionais de fitatos e taninos *Rev Nutr* **12**(1):5-19.
- Silva, S. D. A., Antunes, L. E. C., Anthonisen, D. G., Lemões, J. S., Gonçalves, E. D. (2008). Caracterização de Genótipos de Mirtilo Utilizando Marcadores Moleculares. *Rev Bras Frutic Jaboticabal* **30**(1): 180-184.
- Silveira, N. G. A., Vargas, P. N., Rosa, C. S. (2007). Teor de polifenóis e composição química do mirtilo do grupo highbush." *Alimentos e Nutrição* **18**(4): 365-370.
- Singh, N.; Subramanian, K.; Kanwar, R. K.; Cheung, C. H. A.; Kanwar, J. (2014). "Clinical aspects for surviving: a crucial molecule for targeting drug-resistant cancers". *Drug Discovery Today*.

- Sousa, M. B., Curado, T., Vasconcelos, F. N., Trigo, M. J. (2007). Mirtilo: Qualidade pós-colheita. Divulgação AGRO **55**(8):1-14.
- Souza, V. R., Pereira, P. A. P., da Silva, T. L. T., Lima, L. C. O., Pio, R., Queiroz, F. (2014). "Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brasilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruit." Food Chemistry **156**: 362-368.
- Srivastava, A., Akoh, C. C., Fischer, J., Krewer, G. (2007). "Effect of Anthocyanin Fractions from Selected Cultivars of Georgia-Grown Blueberries on Apoptosis and Phase II Enzymes". J Agric Food Chem. **55**:3180-3185.
- Stone, S. Z., Yasmin, T., Bagchi, M., Archana, C., Joe, A. V., Bagchi, D. (2007). "Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention." Mol Nutr Food Res **51**: 675:683.
- Sylvester, P. M. (2011). "Optimatization of the tetrazolium dye (MTT) colorimetric assay for cellular growth and viability." Methods Mol Biol **716**:157-168.
- Taiz, L.; Zeiger, E. Fisiologia Vegetal. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 918p.
- Tan, M.L.; Ooi, J.P.; Ismail, N.; Moad, A.I.H.; Muhammad, T.S.T. (2009). "Programmed cell death pathways and current antitumor targets". Pharmaceutical research. **26**(7):1547–60.
- Triebel, S., Trieu, H., & Richling, E. (2012). "Modulation of Inflammatory Gene Expression by a Bilberry (*Vaccinium myrtillus L.*) Extract and Single Anthocyanins Considering Their Limited Stability under Cell Culture Conditions" Journal of Agricultural and Food Chemistry **60**(36): 8902-8910.
- Vogelstein, B. & Hinzler, K. (2004). "Cancer genes and the pathways they control" Nature Medicine **10**(8): 789-799.
- Vrhovsek, U., Masuero, D., Palmieri, L., Mattivi, F. (2012)."Identification and quantification of flavonol glycosides in cultivated blueberry cultivars." Journal of Food Composition and Analysis **25**: 9-16.
- Wang, P., Henning, S. M., Heber, D. (2010). "Limitations of MTT and MTS-Based assays for measurement of antiproliferative activity of green tea polyphenols." PLoS One **5**(4):10.137-10.202.
- WHO. (2013). "WHO - World Health Organization."
- Williams, M., I. Tietzel & Q. A. Quick (2013). "1'-Acetoxychavicol acetate promotes caspase 3-activated glioblastoma cell death by overcoming enhanced cytokine expression." Oncol Lett **5**(6): 1968-1972.
- Yi, W., Fischer, J., Krewzr, G., Akoh, C. (2005). "Phenolic compounds from blueberries can inhibit colon cancer cell proliferation and induce apoptosis." J Agric **53**: 7320-7329.

- Youdim, K. A., Hale, S. B., MacKinnon, S., Kalt, W., Joseph, J. A. (2000). "Polyphenolics enhance red blood cell resistance to oxidative stress: in vitro and in vivo." Biochimica et Biophysica Acta **1523**: 117-122.
- Yun, J., Afaq, F., Khan, N., Mukhtar, H. (2009). "Delphinidin an anthocyanindin in pigmented fruits and vegetables, induces apoptosis and cell cycle arrest in human colon cancer HCT116 cells." Molecular carcinogenesis **48**: 260-270.
- Zafra-Stone, S., Yasmin, T., Bagchi, M., Chatterjee, A., Vinson, J.A., Bagchi, D., (2007). "Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention." Molecular Nutrition & Food Research. **51**: 675-683.
- Zhang, S., C. N. Ong and H. M. Shen (2004). "Involvement of proapoptotic Bcl-2 family members in parthenolide-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis." Cancer Lett **211**(2): 175-188.