

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA

Dariane Trivisiol da Silva

**COMPOSTOS FENÓLICOS DE MIRTILO (*Vaccinium* sp.): EXTRAÇÃO COM  
SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE EM MODELO DE ÚLCERA GÁSTRICA**

Santa Maria-RS, Brasil  
2018



**Dariane Trivisiol da Silva**

**COMPOSTOS FENÓLICOS DE MIRTILO (*Vaccinium sp.*): EXTRAÇÃO COM  
SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS E AVALIAÇÃO DA  
ATIVIDADE EM MODELO DE ÚLCERA GÁSTRICA**

Dissertação apresentada ao Curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Tatiana Emanuelli  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Milene Teixeira Barcia

Santa Maria-RS, Brasil  
2018

Da Silva, Dariane Trivisiol  
Compostos fenólicos de mirtilo (*Vaccinium* sp.):  
extração com solventes eutéticos profundos naturais e  
avaliação da atividade em modelo de úlcera gástrica /  
Dariane Trivisiol Da Silva.- 2018.  
154 p.; 30 cm

Orientadora: Tatiana Emanuelli  
Coorientadora: Milene Teixeira Barcia  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós  
Graduação em Farmacologia, RS, 2018

1. Mirtilo 2. Solvente verde 3. Polifenóis 4.  
Antioxidantes 5. Úlcera gástrica I. Emanuelli, Tatiana  
II. Teixeira Barcia, Milene III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

©2018

Todos os direitos autorais reservados a Dariane Trivisiol da Silva. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

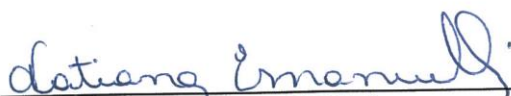
E-mail: [daritrivisiolsilva@hotmail.com.br](mailto:daritrivisiolsilva@hotmail.com.br)

**Dariane Trivisiol da Silva**

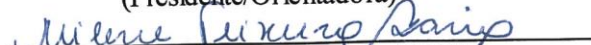
**COMPOSTOS FENÓLICOS DE MIRTILO (*Vaccinium sp.*): COM SOLVENTES  
EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EM  
MODELO DE ÚLCERA GÁSTRICA**

Dissertação apresentada ao Curso de  
mestrado do Programa de Pós-Graduação em  
Farmacologia, da Universidade Federal de Santa  
Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para  
obtenção do grau de **Mestre em Farmacologia**.

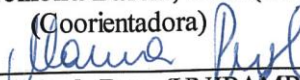
**Aprovado em 04 de Maio de 2018:**



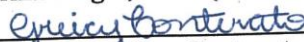
**Tatiana Emanuelli, Dra. (UFSM)**  
(Presidente/Orientadora)



**Milene Teixeira Barcia, Dra. (UFSM)**  
(Coorientadora)



**Marina Prigol, Dra. (UNIPAMPA)**



**Greicy Michelle Marafiga Conterato, Dra. (UFSC)**

Santa Maria-RS, Brasil  
2018



Dedico este trabalho a toda minha família, minha eterna fonte de luz, força e inspiração.





## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus pela vida, pela força concedida nos momentos de dificuldade, por me guiar nas minhas escolhas e por colocar no meu caminho pessoas maravilhosas.

Aos meus pais, Clair e Arlei que são a minha base, o meu maior orgulho. À vcs a minha eterna gratidão, pela pessoa que me tornei, valores ensinados e por não medirem esforços na minha educação e das minhas irmãs, abdicando muitas vezes dos seus próprios sonhos.

Às minhas amadas irmãs Cristiane e Mariane, por serem meu porto seguro, minhas melhores amigas e pelo grande amor que une. Vocês são a minha inspiração.

Ao meu namorado Lucas, por todo o amor dedicado, paciência, companheirismo e por me ajudar a me tornar uma pessoa melhor.

Agradeço ao meu querido cunhado Jonas, pelos seus valiosos conselhos, otimismo contagiante e pela sua disponibilidade em me ajudar.

À minha amada vó Ida, pela sua força e amor incondicional.

À minha orientadora, Tatiana Emanuelli pelos conhecimentos compartilhados durante todos esses anos, apoio, paciência e principalmente pela mão estendida nos momentos mais difíceis de minha vida.

Aos meus queridos amigos e colegas do NIDAL, Luana, Lauren, Andréia, Roberson, Natália, Renata, Sabrina Silva, Lisiane, Sabrina Marafiga, Sabrina Somacal, pela imensa ajuda nos experimentos, companheirismo, conhecimentos compartilhados. Este trabalho só foi possível porque eu tive vocês ao meu lado. À vocês a minha mais sincera gratidão.

Aos demais grandes amigos Miguel, Caroline, Júlia, Cristine, Jéssica, Daniela, Bruna, Anissa pela amizade, companheirismo e apoio. Considero-me um pessoa de sorte por tê-los em minha caminhada.

À minha coorientadora Milene T. Barcia, pelos ensinamentos compartilhados, disponibilidade e paciência na minha trajetória inicial na pós graduação.

À Vivian C. Bochi por toda a ajuda ao darmos início no trabalho, pela sua atenção e incentivo.

A todos os amigos e colegas do NIDAL, em especial Jaqueline, Amanda, Carlos, Prof. Laerte, Luciano, Diego, e Gustavo pela ajuda com as análises e empréstimo de materiais, também pelo companheirismo, apoio, e amizade.

Aos professores Marcelo L. da Veiga e Maria Izabel U. M. da Rocha pela contribuição nas análises histológicas.

À Professora Liliane de F. Bauermann pela sua gentil colaboração no desenvolvimento do modelo de úlcera gástrica.

Aos professores Marina Prigol, Greicy M. M. Conterato e Liliane de F. Bauermann por aceitarem o convite para compor a banca examinadora dessa dissertação.

À Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, por possibilitar minha pós-graduação em uma universidade pública e de tamanha excelência.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização desse trabalho.

## RESUMO

### COMPOSTOS FENÓLICOS DE MIRTILO (*Vaccinium sp.*): EXTRAÇÃO COM SOLVENTES EUTÉTICOS PROFUNDOS NATURAIS E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE EM MODELO DE ÚLCERA GÁSTRICA

AUTOR: Dariane Trivisiol da Silva

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tatiana Emanuelli

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Milene Teixeira Barcia

A úlcera gástrica é uma desordem gastrointestinal crônica que promove a geração excessiva de espécies reativas de oxigênio, o que resulta em estresse oxidativo e posterior agravamento do quadro clínico da doença. Desse modo, a introdução de antioxidantes na dieta pode ser uma alternativa para prevenção e tratamento da doença. O mirtilo é uma fruta rica em polifenóis e a extração destes compostos de modo bio sustentável e seguro tem se tornado muito atrativa. Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi desenvolver um método de extração bio sustentável através do uso de solvente eutético profundo natural (NADES), para a obtenção de compostos bioativos do mirtilo e avaliar a atividade biológica do extrato em modelo de úlcera gástrica em ratos. Primeiramente, otimizou-se um método de extração baseado em NADES para antocianinas de mirtilo usando um planejamento experimental multivariado para encontrar a melhor razão molar de solvente. Neste estudo foram avaliadas todas as proporções possíveis (0-100%) para uma mistura de três componentes, constituída de cloreto de colina:glicerol:ácido cítrico. Cloreto de colina:glicerol:ácido cítrico na proporção molar de 0,5:2:0,5 (NADES 9) foi o NADES ideal para a extração das antocianinas. O NADES 9 foi tão eficiente como o solvente orgânico (metanol:água:ácido fórmico) quando comparado na mesma proporção amostra:solvente e extraiu cerca de 76% das antocianinas do mirtilo em comparação com uma extração exaustiva com solvente orgânico. Além disso, NADES 9 resultou em extrato com maior proporção de antocianinas do tipo arabinosídeos e menor proporção de galactosídeos e glicosídeos do que o solvente orgânico. A capacidade antioxidante (avaliada por ORAC e FRAP) da fração antocianina purificada, obtida utilizando o NADES 9, foi maior ou igual às frações extraídas com solvente orgânico. Considerando o efeito promissor do NADES, na segunda parte deste estudo investigou-se o efeito gastroprotetor do extrato bruto do mirtilo (EB) obtido através do uso do NADES e de suas frações ricas em compostos antocianínicos (FRA) e fenólicos não antocianínicos (FRFNA) em modelo de úlcera gástrica em ratos. Os animais foram tratados durante 14 dias com água, veículo NADES, EB (10,0 mg/kg p.c.), FRA (4,2 mg/kg p.c.), FRFNA (5,8 mg/kg p.c.) ou lansoprazol (30,0 mg/kg p.c.) (intragástrico) e após um jejum de 12 horas receberam 75% de etanol (2 mL/kg) para induzir úlcera gástrica. O EB diminuiu o índice de úlcera e preservou a integridade da mucosa gástrica, assim como reduziu a depleção de glutatona e a resposta inflamatória. Todos os tratamentos reduziram a oxidação da proteína e a sobreprodução de NO em ratos tratados com etanol. O veículo NADES também contribuiu para a redução do estresse oxidativo exibido pelo EB. A FRA aumentou o teor de acetato nas fezes, um dos principais ácidos graxos de cadeia curta e parece ser a única responsável pela prevenção da depleção de GSH. Tomados em conjunto, os resultados deste estudo indicam que NADES é um solvente promissor para uma extração bio sustentável de polifenóis e que pode ser aplicado para obter extratos biocompatíveis de mirtilo que exibem efeitos protetores contra úlcera gástrica.

**Palavras-chave:** Mirtilo. Solvente verde. Polifenóis. Antioxidantes. Úlcera gástrica



## ABSTRACT

### **PHENOLIC COMPOUNDS FROM BLUEBERRY (*Vaccinium* sp.): EXTRACTION WITH DEEP NATURAL EUTECTIC SOLVENTS AND EVALUATION OF ACTIVITY IN GASTRIC ULCER MODEL**

AUTHOR: Dariane Trivisiol da Silva

ADVISOR: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tatiana Emanuelli

CO-ADVISOR: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Milene Teixeira Barcia

Gastric ulcer is a chronic gastrointestinal disorder that promotes the excessive generation of reactive oxygen species, which results in oxidative stress and subsequent worsening of the clinical picture of the disease. Thus, the introduction of antioxidants into the diet may be an alternative for prevention and treatment of the disease. Blueberry is a fruit rich in polyphenols and the extraction of these compounds in a safe and eco-friendly manner have become very attractive. In this context, the objective of this study was to develop an eco-friendly extraction method using deep natural eutectic solvents (NADES), to obtain bioactive compounds from blueberry and to evaluate the biological activity of the extract in the gastric ulcer model in rats. First, a NADES-based method for extracting blueberry anthocyanins was optimized using a multivariate experimental design to find the best solvent molar ratio. In this study, all possible proportions (0-100%) were evaluated for ternary mixtures composed by choline chloride:glycerol:citric acid. Choline chloride:glycerol:citric acid at the molar ratio 0.5:2:0.5 (NADES 9) was the ideal NADES for extracting blueberry anthocyanins. NADES 9 was as efficient as the organic solvent (methanol:water:formic acid) when compared at the same sample:solvent ratio and yielded about 76% of blueberry anthocyanins compared to an exhaustive extraction with organic solvent. NADES 9 yielded higher proportion of arabinoside anthocyanins and lower proportion of galactoside and glucoside anthocyanins than the organic solvent. The antioxidant capacity (ORAC and FRAP assays) of the purified anthocyanin fraction obtained using NADES 9 was greater than or equal to the fractions extracted using organic solvent. Considering the promising effect of NADES, the second part of this study was aimed to investigate the gastroprotective effect of crude blueberry NADES-based extract (CE) and its fractions anthocyanin-rich fraction (ARF) and non-anthocyanin phenolic fraction (NAPF) in a gastric ulcer model in rats. The animals were treated for 14 days with water, vehicle NADES, CE (10.0 mg/kg b.w.), ARF (4.2 mg/kg b.w.), NAPF (5.8 mg/kg b.w.) or lansoprazole (30.0 mg/kg b.w.) (intragastric) and after a 12-hour fasting received 75% ethanol (2 mL/kg) to induce gastric ulcer. EB decreased ulcer index and preserved the integrity of gastric mucosa, as well as reduced glutathione depletion and inflammatory response. All treatments reduced protein oxidation and NO overproduction in ethanol-treated rats. The NADES vehicle also contributed to the effect of CE in reducing the oxidative stress. ARF increased fecal acetate levels, an important short-chain fatty acid, and seems to be sole responsible for the prevention of GSH depletion. Taken together, the results of this study indicate that NADES is a promising solvent for eco-friendly extraction of polyphenols and can be used to obtain biocompatible extracts of blueberry that exhibit protective effects against gastric ulcer.

**Keywords:** Blueberry. Green solvent. Polyphenols. Antioxidants. Gastric ulcer



## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### INTRODUÇÃO

Figura 1: Regiões do estômago e sua estrutura histológica.....	19
Figura 2: Regulação da secreção de ácido clorídrico pela célula parietal.....	20
Figura 3: Esquema da remoção de espécies reativas e xenobióticos pelas enzimas antioxidantes.....	27
Figura 4: Mirtilo grupo rabbiteye ( <i>Vaccinium ashei</i> R.) (A) e Mirtilo grupo highbush ( <i>Vaccinium corymbosum</i> L.) (B). ....	32
Figura 5: Estrutura dos principais flavonoides encontrados no mirtilo. R1 e R2 na estruturadas antocianidinas podem ser H, OH, OCH <sub>3</sub> dependendo da aglicona. ....	35
Figura 6: Formação, absorção e transformação dos AGCC. ....	39
Figura 7: Ilustração esquemática da regulação da via Nrf2 sob condições basais, de estresse e via indutores. ....	40

### MANUSCRITO 1

Figure 1: Total anthocyanin extraction yields for different NADES vs. organic solvent (non-exhaustive extraction) (A) or for NADES 9 vs. acidified water and organic solvent (non-exhaustive and exhaustive extraction) (B).....	84
Figure 2: Relationship between the oxygen radical absorbance capacity (ORAC), ferric reducing antioxidant power (FRAP) and total monomeric anthocyanin content of anthocyanin-rich fractions.....	85
Figure S1: HPLC chromatograms of anthocyanin-rich fractions extracted from blueberry fruits using different solvents (non-exhaustive extraction): MetOH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (A); NADES 9 (B); water:1% citric acid (C) at 520 nm:.....	90

### MANUSCRITO 2

Figure 1: Experimental design.....	123
Figure 2: Effect of blueberry CE and your anthocyanins and non-anthocyanic polyphenols fractions in appearance macroscopic of stomach. Index ulcer (A) and % protection ulceration (B).....	125
Figure 3: Representative histology of the stomach tissue from: Control (A); Water (B); CE (C); ARFs (D); NAPFs (E); LAN (F) Representative histology of the stomach tissue from: Control (A); Water (B); CE (C); ARFs (D); NAPFs (E); LAN (F) .....	126
Figure 4: Effect of blueberry CE and your anthocyanins and non-anthocyanic polyphenols fractions in AOPP (A) and NOx levels (B) and GSH/GSSG ratio (C)....	127
Figure 5: Effect of blueberry CE and your anthocyanins and non-anthocyanic polyphenols fractions in SOD (A), GR (B), GST (C), GPx (D) .....	128
Figure 6: Effect of blueberry CE and your anthocyanins and non-anthocyanic polyphenols fractions on Nrf2 translocation in gastric mucosa. (A) Representative blots of cytosolic and nuclear Nrf2, $\beta$ -actin and lamin-B1 expression and (B) Cytosolic/Nuclear Nrf2 content ratio .....	129
Figure 7: Effect of blueberry CE and your anthocyanins and non-anthocyanic polyphenols fractions in MPO activity Effect of blueberry CE and your anthocyanins and non-anthocyanic polyphenols fractions in MPO activity .....	130
Figure 8: Effect of blueberry CE and your anthocyanins and non-anthocyanic polyphenols fractions in short-chain fatty acids.....	131





## LISTA DE TABELAS

### DESENVOLVIMENTO

Tabela 1: Planejamento simplex centróide para a otimização da composição de NADES. .....	43
---	----

### MANUSCRITO 1

Table 1: Simplex centroid design and observed response for the optimization of NADES composition* for anthocyanin extraction .....	80
Table 2: Yield and price of mixtures of deep eutectic solvent compared to acidified water and organic solvent*.....	81
Table 3: Characterization of anthocyanin profile in anthocyanin-rich fractions extracted from blueberry fruits using organic solvent, NADES, and water: 1% citric acid. ....	82
Table 4: Antioxidant activity of the anthocyanin-rich fraction extracted from blueberry fruits using different solvents. ....	83
Table S1: Parameters of linear regression, LOD, LOQ and precision for anthocyanin quantification by HPLC analysis. ....	87
Table S2: ANOVA results of the regression models estimated from simplex centroid design for the optimization of NADES composition.....	88
Table S3: Physico-chemical characteristics of NADES 9 (ChCl:gly: citric acid at 0.5:2:0.5 molar ratio and diluted with 25% water). ....	89



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- NO - Óxido nítrico
- OH - Radical hidroxil
- AA - Ácido araquidônico
- ADH - Alcool desidrogenase
- AINES - Anti-inflamatórios não esteroidais
- Akt - Proteína quinase B
- ALDH – Aldeído desidrogenase
- AMPC - Adenosina monofosfato cíclico
- ANOVA - Análise de variância
- ARE – Elementos de resposta antioxidante
- Bax – Proteína pró-apoptótica
- Ca<sup>2+</sup> - Cálcio divalente
- CAT- Catalase
- CCK2 - Receptores de gastrina/colecistocinina do tipo 2
- ChCl – Cloreto de colina
- Cl<sup>-</sup> - Íons cloreto
- COX – ciclooxigenase
- Cu/Zn SOD - Superóxido dismutase dependente de cobre e zinco
- DAG - Diacilglicerol
- ECL - Células enterocromafins
- eNOS - Óxido nítrico sintase endotelial
- EP1 - Receptores de prostaglandina tipo 1
- EP3 - Receptores de prostaglandina tipo 3
- ERK1/2 - Quinase reguladora extracelular
- ERNs - Espécies reativas de nitrogênio
- EROs - Espécies reativas de oxigênio
- ERs - Espécies reativas
- FRA – Fração rica em antocianinas
- FRFNA – Fração rica em fenólicos não antociânicos
- GPR109a - Receptores acoplados a proteína g 109<sup>a</sup>
- GPR41 - Receptores acoplados a proteína g 41

GPR43 - Receptores acoplados a proteína g 43  
GPx - Glutaciona peroxidase  
GR - Glutaciona redutase  
GSH - Glutaciona reduzida  
GST – Glutaciona-stransferase  
H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> - Peróxido de hidrogênio  
HCl - Ácido clorídrico  
HOCl - Ácido hipocloroso  
IBPs – Inibidores da bomba de prótons  
ICAM-1 - Molécula de Adesão Intercelular-1  
IFN-gama – Interferon-gama  
IKK $\beta$  - Complexo I $\kappa$ B quinase tipo beta  
IL-1 - Interleucina 1  
IL-12 – Interleucina 12  
IL-1B – Interleucina 1-beta  
IL-6 - Interleucina 6  
IL-8 – Interleucina 8  
iNOS - Óxido nítrico sintase induzível  
I $\kappa$ B -  $\alpha$  – Proteína inibitória tipo alfa  
JNK - c-Jun amino terminal quinase  
JNK - Quinase c-Jun n-terminal  
Keap-1 - Kelch ECH associating protein 1  
Km - Constante de Michaelis e Menten  
Mafs - Fibrosarcoma musculoaponeurótico  
MCP-1 - Proteína quimiotática de monócitos-1  
Mg SOD - Superóxido dismutase dependente de manganês  
MPO – Mieloperoxidase  
NADES – Solvente eutético profundo natural  
NADP<sup>+</sup> - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato  
NADPH - Nicotinamida adenina dinucleotídeo reduzida  
NF- $\kappa$ B - Fator nuclear kappa B  
Nnos - Óxido nítrico sintase neuronal  
NOS - Óxido nítrico sintase  
Nrf2 - Fator nuclear eritróide relacionado ao fator 2

O<sub>2</sub><sup>•-</sup> - Ânion radical superóxido

HO-1 - Heme oxigenase 1

ONOO<sup>-</sup> - Peroxinitrito

ORAC - Capacidade de absorção do radical oxigênio

PCNA - Antígeno Nuclear da Proliferação Celular

PGE2 - Prostaglandina E2

PGG2 - Prostaglandina G2

PGH2 - Prostaglandina H sintetase

PGI2 - Prostaglandina I2

PGs - Prostaglandinas

PI3K - Fosfatidilinositol-3-quinase

SLC16A1 - Família de veículo de soluto 16 (transportadores de ácido monocarboxílico), membro 1

SLC5A8 - Transportador de monocarboxilato acoplado ao sódio

SOD - Superóxido dismutase

TBARS - Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúico

TBS -

TGI - Tratogastrointestinal

TLR4 - Receptor do tipo Toll 4

TNF- $\alpha$  - Fator de necrose tumoral tipo alfa

UGs - Úlceras gástricas

UPs - Úlceras Pépticas



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	17
1.1 REFERENCIAL TEÓRICO .....	18
<b>1.1.1 Estômago</b> .....	18
<b>1.1.2 Mecanismo de produção, secreção e liberação ácida</b> .....	19
<b>1.1.3 Fatores protetores da mucosa gástrica</b> .....	21
<b>1.1.4 Úlceras pépticas</b> .....	23
1.1.4.1 <i>Úlceras gástricas</i> .....	23
1.1.4.1.1 Modelos de indução de úlcera gástrica .....	24
1.1.4.1.2 Úlcera gástrica e estresse oxidativo induzido pelo etanol .....	25
1.1.4.1.3 Úlcera gástrica e inflamação induzida pelo etanol .....	29
1.1.4.1.4 Terapêutica .....	30
<b>1.1.5 Mirtilo</b> .....	31
1.1.5.1 <i>Métodos alternativos de extração de polifenóis: Solventes eutéticos profundos naturais</i> .....	32
1.1.5.2 <i>Antocianinas e compostos fenólicos não antociânicos</i> .....	34
1.1.5.3 <i>Polifenóis e seus benefícios no tratogastrointestinal</i> .....	37
1.1.5.4 <i>Polifenóis e a via do Nrf2</i> .....	40
1.2 OBJETIVOS .....	41
<b>1.2.1 Objetivo geral</b> .....	41
<b>1.2.2 Objetivos específicos</b> .....	41
1.3 MATERIAL E MÉTODOS .....	42
<b>1.3.1 Local de desenvolvimento da pesquisa</b> .....	42
<b>1.3.2 Obtenção e composição nutricional das amostras</b> .....	42
1.3.2.1 <i>Amostras de mirtilo</i> .....	42
1.3.2.2 <i>Composição centesimal</i> .....	42
<b>1.3.3 Extração de polifenóis do mirtilo utilizando NADES</b> .....	42
1.3.3.1 <i>Preparação de NADES e características físico-químicas</i> .....	42
1.3.3.2 <i>Avaliação da eficiência de extração dos NADES pelo delineamento simplex-centróide</i> .....	44
1.3.3.3 <i>Extração com solventes convencionais</i> .....	44
1.3.3.4 <i>Extração em fase sólida (SPE)</i> .....	45
1.3.3.5 <i>Determinação da capacidade antioxidante</i> .....	45
1.3.3.6 <i>Análise de antocianinas por HPLC-MS/MS</i> .....	45
<b>1.3.4 Experimento <i>in vivo</i></b> .....	46
1.3.4.1 <i>Local de desenvolvimento da pesquisa</i> .....	47
1.3.4.2 <i>Preparação do extrato bruto de mirtilo a base de NADES e isolamento das frações do extrato</i> .....	47
1.3.4.3 <i>Delineamento experimental</i> .....	47
1.3.4.4 <i>Coleta do material biológico</i> .....	49
1.3.4.5 <i>Análises</i> .....	49
<b>2 DESENVOLVIMENTO</b> .....	53
2.1 MANUSCRITO 1 .....	53
2.2 MANUSCRITO 2 .....	91
<b>3 DISCUSSÃO</b> .....	132
<b>4 CONCLUSÃO</b> .....	136
<b>5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	137
<b>ANEXO A</b> .....	153
<b>ANEXO B</b> .....	154





## **APRESENTAÇÃO**

Esta dissertação está apresentada no formato de manuscritos científicos integrados, seguindo as normas do Manual de Dissertações e Teses da UFSM (MDT), versão 2015.

O trabalho está organizado da seguinte forma: primeiramente é apresentada a INTRODUÇÃO, contendo o referencial teórico, os objetivos e material e métodos utilizados para a execução dessa dissertação. A seguir é apresentado o DESENVOLVIMENTO, que traz os resultados que fazem parte deste documento e que serão apresentados sob a forma de dois manuscritos. As seções Material e Métodos, Resultados, Discussão e Referências Bibliográficas, encontram-se nos próprios manuscritos e representam na íntegra este estudo.

Os itens DISCUSSÃO GERAL e CONCLUSÃO, dispostos após o item DESENVOLVIMENTO, contêm interpretações dos principais resultados da dissertação. A seção REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS apresenta a bibliografia citada na seção INTRODUÇÃO desta dissertação.



## 1 INTRODUÇÃO

A úlcera gástrica é umas das desordens gastrointestinais mais comuns na prática clínica afetando cerca de 10% da população mundial (LAURET et al., 2015). Destaca-se como uma doença crônica e recorrente com reincidência de 60% a 80% em até um ano após a cura e quase 100% em até dois anos. Além disso, a úlcera gástrica é considerada um problema de saúde pública de relevância econômica mundial devido ao elevado custo do tratamento (HABEEB et al., 2016). Suas causas estão relacionadas ao desequilíbrio entre os agentes protetores (muco, bicarbonato, óxido nítrico e prostaglandinas) e agressores (ácido clorídrico e pepsina) da mucosa gástrica (SHAKER; MAHMOUD; MNAA, 2010; CEMEK; YILMAZ; BÜYÜKOKUROĞLU, 2010). Dentre os agentes agressores destacam-se ainda as infecções por *Helicobacter pilory*, uso abusivo de álcool, estresse, tabagismo, deficiências nutricionais e uso indiscriminado de anti-inflamatórios não-esteróides (AINES) (CHOI; HWANG; NAM, 2010; SHAKER; MAHMOUD; MNAA, 2010).

Na clínica, o tratamento para a úlcera gástrica consiste na utilização de fármacos antiácidos, inibidores da bomba de prótons, além de outros medicamentos como anticolinérgicos, e antagonistas do receptor de histamina (AWAAD; EL-MELIGY; SOLIMAN, 2013). Entretanto, apesar de existir diversos medicamentos para tratar essa desordem gastrointestinal, o uso prolongado destas terapias medicamentosas pode levar a complicações futuras ainda mais graves, como por exemplo lesões inflamatórias no fígado e câncer (TUKOV et al., 2007; YUAN; PADOL; HUNT, 2006).

Diante disso, faz-se necessário o desenvolvimento de alternativas naturais que possam contribuir na prevenção e/ou tratamento desta patologia, com ausência ou redução de efeitos colaterais. O mirtilo, fruto norte-americano de cultivo recente no Brasil apresenta uma composição fitoquímica rica em compostos antioxidantes (KONDA, 2014). A esses compostos bioativos é atribuído grande potencial biológico, pois desempenham diversos papéis em benefício da saúde humana (KAULMANN; BOHN, 2016). Dessa forma, o mirtilo pode ser uma alternativa interessante na prevenção e/ou tratamento de úlceras gástricas, uma vez que a excessiva geração de espécies reativas é um fator agravante da doença (BHATTACHARYYA et al., 2014).

Apesar de existirem estudos sobre a atividade antioxidante e anti-inflamatória dos polifenóis e, alguns estudos terem revelado o potencial protetor de extratos de mirtilo em modelos de úlcera gástrica (COLANTUONI et al., 1991; OGAWA et al., 2011), as frações de compostos bioativos responsáveis pelo efeito protetor e os mecanismos moleculares

envolvidos neste efeito, especialmente o envolvimento da via do Nrf2, ainda não estão completamente elucidados. Além disso, ainda não foi explorado o uso de solventes eutéticos profundos na obtenção de extratos de mirtilo, o que pode resultar em extratos com maior biocompatibilidade e atividade biológica diferenciada.

## 1.1 REFERENCIAL TEÓRICO

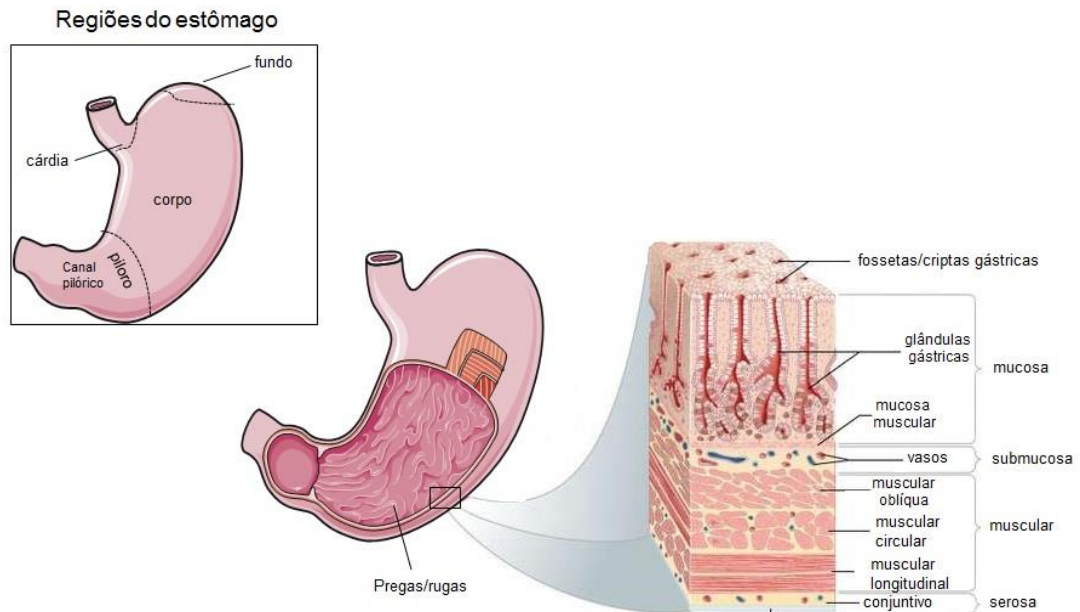
### 1.1.1 Estômago

O estômago é um órgão integrante do trato gastrointestinal (TGI) responsável por transformar o bolo alimentar em quimo, um fluido ácido e espesso (GARTNER; HIATT, 2003). Nesse processo, é realizada a digestão parcial dos alimentos, onde há produção de ácido gástrico e secreção de enzimas como pepsina, renina e lipase gástrica, assim como hormônios parácrinos (HUSVÉTH, 2011).

Anatomicamente, o estômago está situado na cavidade abdominal entre o esôfago e o intestino delgado. É dividido em quatro regiões (Figura 1): CÁRDIA, região situada na junção gastroesofágica; FUNDO, região à esquerda do esôfago e comumente cheia de gás; CORPO compreende a maior região do estômago sendo responsável pela formação do quimo; e por fim o ANTRO ou PÍLORO situado na região proximal ao canal pilórico (DANGELO; FATTINI, 2007).

A parede estomacal é constituída de quatro camadas (Figura 1): mucosa, submucosa, onde são visualizadas pregas e dobras longitudinais, a muscular e a serosa (GARTNER; HIATT, 2003). A superfície estomacal é recoberta por células mucosas superficiais que são especializadas em secretar grandes quantidades de muco. Além disso, na mucosa gástrica são abrigadas numerosas glândulas que liberam substâncias responsáveis pelos processos digestivos e homeostáticos do estômago (SCHUBERT, 2010). Na superfície interna do corpo e fundo do estômago, encontram-se as glândulas oxínticas. São compostas por células mucosas, células pépticas ou principais (responsáveis pela secreção do pepsinogênio), células parietais (contém vesículas que secretam  $H^+$  através da enzima  $H^+K^+ATPase$ ), células D (secretam somatostatina) e células enterocromoafins-símiles (ECL) (secretam histamina) (SCHUBERT, 2005). Na porção antral do estômago localizam-se as glândulas pilóricas, as quais possuem células G (liberam o hormônio gastrina) e também células D (SCHUBERT; PEURA, 2008).

Figura 1: Regiões do estômago e sua estrutura histológica.



Fonte: Adaptado de [www.britannica.com/science/gastric-gland](http://www.britannica.com/science/gastric-gland)

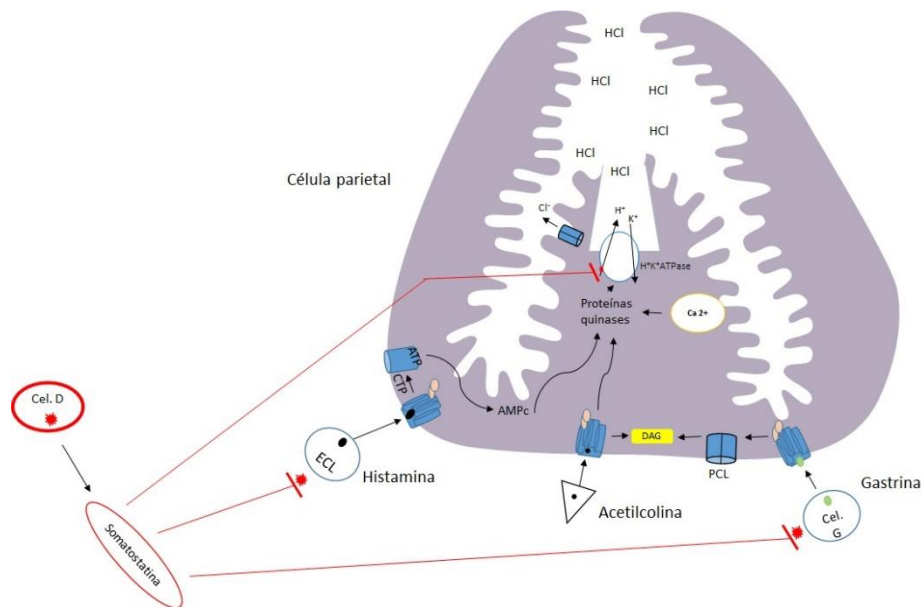
### 1.1.2 Mecanismo de produção, secreção e liberação ácida

Como já mencionado, as células parietais são responsáveis pela secreção gástrica de ácido clorídrico em decorrência da ativação da bomba de prótons  $H^+K^+ATPase$  (SCHUBERT; PEURA, 2008). Essa enzima possui duas subunidades, sendo uma delas o sítio catalítico responsável pela troca iônica de  $H^+$  intracelular pelo  $K^+$  luminal. Esse processo é acompanhado pela liberação de íons  $Cl^-$  via canais de cloro, que juntamente com  $H^+$  formam o  $HCl$  no lúmen gástrico (YOUNES-IBRAHIM, 1997). No estômago, este ácido é extremamente importante para a digestão de proteínas, absorção de ferro e vitamina B12 além de prevenir o desenvolvimento de bactérias e infecções (SCHUBERT, 2010).

No estômago, três importantes vias regulam a secreção gástrica, tais como a acetilcolina (via neuronal); a histamina (via parácrina) e a gastrina (via endócrina) (KONTUREK; KONTUREK; OCHMAŃSKI, 2004). Esses mediadores podem interagir com os receptores acoplados a adenosina monofosfato cíclico (AMPC), o que resulta na fosforilação das proteínas efetoras da célula parietal para liberação da histamina e, com o aumento de cálcio intracelular ( $Ca^{2+}$ ) que atua na liberação de gastrina e acetilcolina (SCHUBERT, 1999).

A acetilcolina liberada por neurônios pós-ganglionares do nervo vago atua diretamente nos receptores muscarínicos M3 estimulando a secreção de HCl. Além disso, pode atuar aumentando a produção de ácido por inibir indiretamente a secreção de somatostatina, potente inibidor da secreção de gastrina pelas células G e histamina pelas células ECL (JAIN et al., 2007). A gastrina, principal estimulador da secreção ácida durante a ingestão de alimentos, é liberada pelas células da mucosa do antro gástrico, e torna-se ativa nos receptores de colecistocinina do tipo 2 (CCK2), estimulando também a liberação de histamina pelas células G (POMMIER et al., 2003). A histamina atua nos receptores H2 nas células parietais, estimulando a secreção do muco e bicarbonato através da ativação dos receptores de prostaglandina tipo EP3 (LAURENCE et al., 2012). Quando há uma redução significativa do pH do lúmen gástrico ocorre um aumento de produção de somatostatina. As células D liberam uma molécula precursora denominada preprossomatostatina que atua inibindo a secreção de ácido clorídrico por impedir a secreção de histamina e gastrina (Figura 2) (SCHUBERT, 2004).

Figura 2: Regulação da secreção de ácido clorídrico pela célula parietal



Fonte: Autoria pessoal. Legenda: AMPc - adenosina monofosfato cíclico; ATP - adenosina trifosfato; Cl<sup>-</sup> - íons cloreto; CTP - citidina trifosfato; DAG - diacilglicerol; ECL - células enterocromafins; H<sup>+</sup> - íons hidrogênio; HCl - ácido clorídrico; PCL - fosfolipase C (isoforma de P).

A regulação fisiológica da secreção de ácido é fundamental para um bom funcionamento do processo digestivo. No entanto, devido ao potencial lesivo de algumas substâncias secretadas durante digestão, a mucosa gastrointestinal conta com uma série de fatores que compõem o seu sistema de defesa. Dentre eles, o muco, o bicarbonato, a produção de prostaglandinas e de óxido nítrico são alguns dos agentes que mantêm a integridade da mucosa intacta durante este processo.

### **1.1.3 Fatores protetores da mucosa gástrica**

O epitélio gástrico pode ser um alvo facilmente lesionado devido a ação de agentes nocivos endógenos, como o próprio HCl, a pepsina, os sais biliares, a variação de pH, a pressão osmótica e a temperatura (PHILLIPSON, 2004). No entanto, substâncias exógenas como medicamentos (mais precisamente os anti-inflamatórios não esteróides - AINES), álcool, tabagismo, estresse e microrganismos são os principais responsáveis pelo comprometimento da mucosa gástrica (HABEEB et al., 2016).

Dentre os mecanismos de defesa, pode-se citar a barreira muco-bicarbonato-fosfolipídeos, o fluxo sanguíneo da mucosa, a produção de prostaglandinas e óxido nítrico e, as defesas antioxidantes (SAID; KAJI; KAUNITZ, 2015). A barreira de muco-bicarbonato-fosfolipídeos consiste na primeira linha de defesa que recobre toda a superfície da mucosa gastrointestinal (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSKI, 2008). O muco é constituído basicamente em 95% de água e 5% de mucina e têm por finalidade reter o bicarbonato secretado pelas células epiteliais para que o microambiente permaneça neutro (ATUMA et al., 2001). Dessa forma, ácidos e pepsinas liberados pelas glândulas gástricas, passam através da camada superficial de muco, e não entram em contato com as células superficiais. A produção de muco pode ser estimulada pelos hormônios gastrointestinais ou então pelas próprias barreiras de proteção como as prostaglandinas (KEMMERL; KAUNITZ, 2013).

Quando há perda da integridade da barreira, a manutenção e a distribuição do fluxo sanguíneo da mucosa podem ser acionados. O fluxo sanguíneo é responsável pelo fornecimento de nutrientes como oxigênio e bicarbonato para a mucosa gástrica, e pela remoção dos produtos residuais do metabolismo celular como o dióxido de carbono (PETERSSON et al., 2006). Somando-se a isso, o fluxo sanguíneo atua ainda removendo H<sup>+</sup> oriundos de uma difusão retrógrada (ABDEL-SALAM et al., 2001).

As prostaglandinas (PGs) são mediadores derivados de ácidos graxos com 20 carbonos, os quais são biossintetizados a partir de vários precursores, sendo um deles o ácido

araquidônico (AA) (BERENBAUM, 2000). O AA é convertido pela ação da ciclooxigenase (COX) em endoperoxídeos instáveis, PGG<sub>2</sub> e PGH<sub>2</sub>. As PGs derivadas do AA são denominadas PGs da série-2, incluindo a PGE<sub>2</sub> e a prostaciclina (PGI<sub>2</sub>), que são fundamentais no TGI (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

As PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub> são responsáveis pela manutenção da integridade da mucosa e proteção contra agentes que causam lesão epitelial, pois inibem a secreção de ácido, estimulam fortemente a secreção de muco e bicarbonato via receptores de prostaglandina tipo EP<sub>1</sub>, aumentando também o fluxo sanguíneo (SAID; KAJI; KAUNITZ, 2015). Além disso, as PGs inibem ainda a ativação de mastócitos e leucócitos, bem como a aderência de plaquetas ao endotélio vascular (LAINE; TAKEUCHI; TARNAWSK, 2008).

Outro fator importante para a proteção do TGI é o óxido nítrico (NO) (KEMMERLY; KAUNITZ, 2013; LANAS, 2008). O NO é sintetizado em um processo catalisado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), o terminal guanidino nitrogenado da L-arginina juntamente com a presença do oxigênio molecular produz NO e L-citrulina (MONCADA, 1993). O NO pode ser produzido de forma independente por três isoformas, a óxido nítrico sintase neuronal, endotelial e induzida (nNOS, eNOS e iNOS, respectivamente). Em condições de homeostase no trato gastrointestinal, as formas constitutivas eNOS e nNOS são expressas no endotélio vascular e no sistema nervoso entérico (LANAS, 2008).

A produção constitutiva de NO é importante para manter a barreira protetora da mucosa gastrointestinal (WALLACE; MILLER, 2000). Esse mecanismo protetor do NO está relacionado com a sua capacidade de aumentar do fluxo sanguíneo da mucosa e estabilizar a influência dos mastócitos (LANAS, 2008). Contudo, o excesso na produção de NO pode passar a ser um agente nocivo para o TGI. A mucosa gástrica quando lesionada favorece a infiltração de leucócitos, os quais produzem elevadas quantidades de NO via iNOS, isoforma induzida nos macrófagos e outras células por lipopolisacárideos bacterianos e/ou citocinas (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Ademais, em condições de estresse oxidativo, o NO pode reagir com o radical ânion superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup>, produzido pelos macrófagos, gerando um potente agente oxidante, o peroxinitrito (NISHIDA; OHTA; ISHIGURO, 1998). Esse radical interage com proteínas, lipídeos e DNA, oxidando-os (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). Em virtude disso, o excesso na produção de NO, juntamente com o estado redox da célula e a superexpressão da iNOS estão associados com estados inflamatórios e disfunções da barreira de muco gástrico (TATEMICHII et al., 2003; BAE et al., 2014).



### 1.1.4 Úlceras pépticas

As úlceras pépticas (UPs) são desordens gastrointestinais multifatoriais causadas por um desequilíbrio entre o ácido gástrico, pepsina e as barreiras de defesa da mucosa gastrointestinal (CHUNG; SHELAT, 2017). Apesar dos avanços na clínica médica, dados epidemiológicos relatam que 10 a 20% dos casos de UPs podem apresentar sérias complicações (ARO et al., 2006). Dentre elas, o sangramento ocorre em aproximadamente 15 a 20% das úlceras agudas, já os casos de hemorragia acometem pacientes com perfurações crônicas (HABEEB et al., 2016).

As UPs são lesões caracterizadas por perda circunscrita de tecido, a qual pode ultrapassar a camada muscular da mucosa (HOPKINS, 2013). Na maioria das vezes, apresenta-se como um lesão arredondada ou ovalada (diâmetro variando de 0,5 a 2,0 cm) de fundo limpo ou coberto por tecido de granulação avermelhado ou fibroso. As UPs são classificadas com base na sua origem anatômica como úlcera gástrica ou duodenal. Úlceras gástricas são encontradas ao longo da alta curvatura do estômago e são mais frequentes em adultos acima de 40 anos (GRAHAM, 2014). Já as úlceras duodenais geralmente ocorrem no bulbo duodenal, área mais exposta ao ácido gástrico e acometem a população mais jovem, entre 20 a 40 anos (MALFERTHEINER; CHAN; MCCOLL, 2009; GRAHAM, 2014).

Embora a incidência e prevalência das UPs não tenha aumentado drasticamente nos últimos anos, essas desordens produzem custos para os serviços de saúde seguidos de elevadas taxas de recidivas, e sérias complicações em pacientes com idade avançada (HABEEB et al., 2016).

#### 1.1.4.1 Úlceras gástricas

As úlceras gástricas (UGs) são desordens gastrointestinais que afetam um número significativo de pessoas em todo o mundo (SHAKER; MAHMOUD; MNAA, 2010). Estima-se atualmente que, 10% da população mundial sofre de úlcera gástrica, sendo que 1% destes podem desenvolver câncer gástrico. A UG, portanto, é extremamente prejudicial para a saúde e é classificada como uma doença pré-cancerosa pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (OMS, 2014). No Brasil, apesar da ausência de registros epidemiológicos de casos de úlcera, sabe-se que há numerosas ocorrências envolvendo essa doença (EISIG; LAUDANNA, 2001).

De acordo com a Federação Brasileira de Gastroenterologia, a manifestação clínica desta patologia incluiu a sensação dolorosa de acidez gástrica seguida de dor, que quando

neutralizada, alivia o sintoma. Também é característica a dor epigástrica, tipo de queimação e vômitos com sinais de sangue, porém em alguns casos pode ser assintomática (FBG, 2015). Por vezes, a subjetividade dos sinais e semelhança dos sintomas com outras dispepsias comprometem o diagnóstico precoce da doença.

A UG é uma doença multifatorial decorrente de um desequilíbrio entre os fatores protetores e agressores da mucosa (LIU et al., 2015). Fatores como infecções bacterianas por *Helicobacter pylori*, ingestão excessiva de AINES, álcool, tabagismo, estresse, além de dietas pouco nutritivas contribuem para o desenvolvimento de úlceras (LIU et al., 2015; SHAKER et al., 2010). As infecções pela bactéria *H. pylori* são consideradas o principal fator etiológico para 70% das úlceras gástricas (ROTHENBACHER; BRENNER, 2003). Contudo, nas últimas décadas sérias complicações no TGI têm sido associadas ao uso de medicamentos AINES (WALLACE, 2008). De fato, vários estudos têm demonstrado que estes medicamentos suprimem a síntese das prostaglandinas comprometendo assim a proteção da mucosa gástrica (RUSSELL, 2001; DRINI, 2017).

Outro fator importante no desenvolvimento de UGs é o consumo abusivo de álcool. O álcool é uma das drogas mais comumente consumidas e, por conseguinte, a indução de distúrbios no TGI é muito comum (BRENNER et al., 1999). O consumo de álcool tem sido relacionado a lesões da mucosa gástrica, incluindo gastrite, úlcera gástrica e até mesmo carcinoma gástrico (FRANKE; TEYSSEN; SINGER, 2006). Entretanto, os mecanismos subjacentes à lesão gástrica induzida pelo etanol ainda não foram totalmente elucidados (ARAB et al., 2015). Na literatura é relatado que a ingestão excessiva de etanol causa hemorragia subepitelial, edema, esfoliação celular, degranulação de mastócitos e infiltração de neutrófilos na mucosa gástrica (BEN BARKA et al., 2017; ADINORTEY et al., 2013). Além disso, com o desequilíbrio do sistema de defesa, a integridade da mucosa é comprometida devido a redução na síntese de fatores chave de proteção como PGs, NO e sistema antioxidante (LAINE et al., 2008). Com a inibição da síntese de PGs consequentemente ocorre redução da produção de muco, redução do fluxo sanguíneo, além de provocar dano no endotélio vascular da mucosa resultando na produção de mais espécies reativas de oxigênio (EROs) (PAN et al., 2008).

#### 1.1.4.1.1 Modelos de indução de úlcera gástrica

Tendo em vista a importância da descoberta da patogênese da úlcera gástrica, modelos experimentais em animais têm sido desenvolvidos e amplamente utilizados. Estes estudos têm

a finalidade de entender as causas envolvidas nesta patologia, bem como desenvolver novos fármacos ou estratégias adjuvantes gastroprotetoras. O etanol é uma das drogas utilizadas para induzir úlcera gástrica nos animais devido a sua capacidade de solubilizar a camada de muco protetora, expondo assim, a mucosa gástrica as ações lesivas do ácido clorídrico e da pepsina (MASSIGNANI et al., 2009). Somado a isso, o etanol reduz o fluxo sanguíneo o que resulta na ruptura do endotélio vascular e facilita ainda mais a permeabilidade da mucosa (ADINORTEY et al., 2013). Concomitantemente, o etanol produz um acúmulo intracelular de cálcio que ativa enzimas como as endonucleases e proteases, as quais promovem a esfoliação no epitélio superficial e apoptose (BOLIGON et al., 2014).

No processo de úlcera gástrica induzida pelo etanol, além do dano direto na mucosa, ocorre um desequilíbrio entre as defesas antioxidantes e as EROs e ERNs, as quais possuem alta reatividade e atacam constituintes celulares como lipídios, proteínas e ácidos nucleicos (KAHRAMAN et al., 2003). A liberação excessiva do ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) e radicais hidroperóxidos ( $^{\bullet}OH$ ) instalam o quadro de estresse oxidativo, evidenciado por níveis aumentados de peroxidação lipídica seguido de oxidação proteica e morte celular (BEN BARKA et al., 2017; KAHRAMAN et al., 2003; ARAB et al., 2015). Além disso, também é observada infiltração de leucócitos, sendo estes recrutados por citocinas pró-inflamatórias e aumento da atividade da mieloperoxidase (MPO), enzima responsável pela geração de ácido hipocloroso e presente em leucócitos da linhagem granulocítica e monocítica (ARAB et al., 2015).

O modelo de úlcera gástrica induzida pelo etanol é amplamente aplicado na prática, uma vez que assemelha-se fortemente a úlceras gástricas em humanos (BRZOWSKI et al., 1998; ADINORTEY et al., 2013). Além do mais, é considerado ideal para avaliar o potencial gastroprotetor de compostos com potencial citoprotetor e/ou antioxidante (THABREW; ARAWWAWALA, 2016). Para a indução de úlceras com etanol em ratos, é necessário um jejum de no mínimo 12 horas, visto que o esvaziamento gástrico é um fator crucial para uma indução efetiva (ALMASAUDI et al., 2016). A concentração de etanol utilizada para este modelo pode variar de 99 a 95% até soluções de 75% de etanol, conforme descrito por Robert (1979) apud (ADINORTEY et al., 2013).

#### 1.1.4.1.2 Úlcera gástrica e estresse oxidativo induzido pelo etanol

O TGI é um alvo contínuo da geração de espécies reativas (ERs), uma vez que em quantidades basais, ERs desempenham papéis fisiológicos importantes para manter as funções

celulares (PÉREZ et al., 2016). No entanto, quando há um desequilíbrio entre a produção de ERs e o sistema de defesa antioxidante da célula, um quadro de estresse oxidativo é instaurado. As ERs incluem radicais livres, com um ou mais elétrons desemparelhados, assim como espécies que não apresentam elétrons desemparelhados, e mesmo assim são bastante reativas. As espécies reativas de oxigênio (EROs) apresentam elétrons desemparelhados no átomo de oxigênio, enquanto as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) apresentam elétrons desemparelhados no átomo de nitrogênio (BHATTACHARYYA et al., 2014). As principais EROs e ERNs envolvidas nos processos patológicos são: o ânion radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxil ( $\bullet OH$ ), o óxido nítrico ( $\bullet NO$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), o peroxinitrito ( $ONOO^-$ ) e o ácido hipocloroso ( $HOCl$ ) (HALLIWELL, 2015).

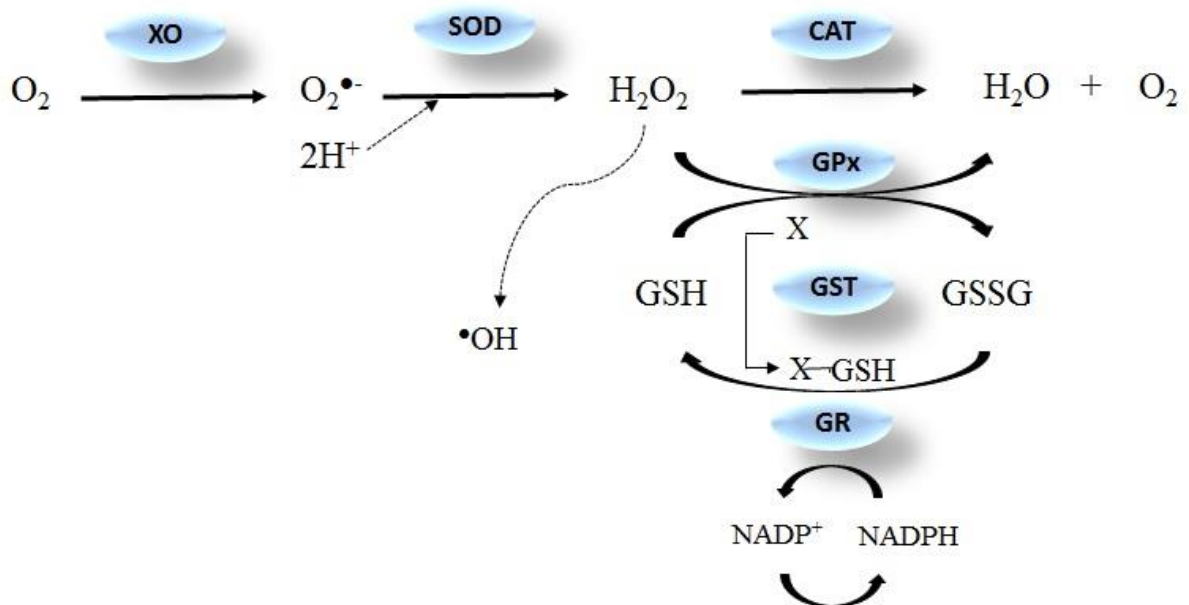
A mitocôndria é uma das vias principais no desenvolvimento de estresse oxidativo pelo etanol. O etanol é metabolizado em acetaldeído pela enzima citosólica álcool desidrogenase (ADH) e, logo após é convertido em acetato pela enzima aldeído desidrogenase mitocondrial 2 (ALDH2) (MANZO-AVALOS; SAAVEDRA-MOLINA, 2010). Em concentrações elevadas de etanol, a ALDH2 atinge o seu ponto de saturação e a acumulação de acetaldeído é aumentada. O acetaldeído então escapa para corrente sanguínea e danifica os complexos de transporte de elétrons I e III levando à produção de EROS, afetando a cadeia de transporte de elétrons (ETC), síntese de ATP e fosforilação oxidativa (BAILEY, 2003). Além disso, no metabolismo do etanol, o consumo de  $NADP^+$  como cofator é aumentado pelas enzimas, o que também contribui para a produção de EROS (BAILEY; PIETSCH; CUNNINGHAM, 1999).

O estresse oxidativo é um fator crucial no desenvolvimento de UGs induzidas pelo etanol, pois é responsável pela perda de integridade mucosa causada em úlceras (ISMAIL et al., 2012). Estudos indicam que o etanol estimula a mucosa gástrica a produzir um excesso de radicais livres  $O_2^{\bullet-}$ ,  $\bullet OH$  e  $H_2O_2$ , os quais agredem todos os componentes celulares. Inicialmente, as membranas celulares são as mais suscetíveis a peroxidação lipídica decorrente da ação dos EROs, resultando em alterações na sua estrutura e permeabilidade (TAMURA et al., 2013). Estudos apontam níveis elevados de EROs e marcadores de oxidação lipídica como substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) em ratos induzidos a úlcera gástrica com etanol (AMARAL et al., 2013; INEU et al., 2013; BEN BARKA et al., 2017). Além disso, o excesso de EROs também pode atacar proteínas e moléculas como açúcares e lipídios, gerando compostos carbonílicos. Os grupamentos derivados de carbonila são altamente reativos e resultam da oxidação das cadeias laterais de resíduos de aminoácidos como a lisina, arginina, prolina e treonina (OKTAVIYANTI;

THALIB; SUHARTONO, 2016). Altos níveis de carbonilação proteica e TBARS estão associados ao dano oxidativo na mucosa gástrica induzida pelo etanol (KAHRAMAN et al., 2003).

Entretanto, o estresse oxidativo na mucosa gástrica pode ser minimizado por mecanismos de defesa enzimática e não enzimática que neutralizam as espécies reativas geradas em excesso. As principais enzimas envolvidas na defesa enzimática são a superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutatona peroxidase (GPx) e glutatona redutase (GR), que constituem a primeira linha de defesa contra as EROs (Figura 3). Uma enzima chave na detoxificação de xenobióticos é a glutatona-s-transferase (GST).

Figura 3: Esquema da remoção de espécies reativas e xenobióticos pelas enzimas antioxidantes.



Fonte: Autoria pessoal. CAT- catalase; GPx - glutatona peroxidase; GR - glutatona redutase; GSH - glutatona; GST - glutatona-s-transferase; GSSG - glutatona dissulfeto;  $\text{H}_2\text{O}_2$  - peróxido de hidrogênio;  $\text{NADP}^+$  - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato;  $\text{NADPH}$  - nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato reduzida;  $\text{O}_2^{\bullet-}$  - ânion radical superóxido;  $\text{O}_2$  - oxigênio;  $\bullet\text{OH}$  - radical hidroxil; SOD - superóxido dismutase; X - xenobiótico; XO - xantina oxidase.

As SODs são metaloenzimas que catalisam a remoção do radical  $\text{O}_2^{\bullet-}$  dismutando-o em  $\text{H}_2\text{O}_2$  (BHATTACHARYYA et al., 2014). A SOD é encontrada sob três isoformas nos

mamíferos: SOD citosólica e SOD extracelular, ambas dependentes de cobre e zinco (Cu/Zn SOD) e a SOD mitocondrial dependente de manganês (MgSOD) (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 1999). O  $H_2O_2$  é um produto ainda muito reativo e pode ser detoxificado em água e oxigênio pelas enzimas CAT e GPx (Figura 3).

A CAT atua convertendo o  $H_2O_2$  em  $H_2O$  e  $O_2$  e está localizada principalmente nos peroxissomos. Embora todos os órgãos expressem esta enzima, a CAT têm sua expressão mais pronunciada no fígado, rins e eritrócitos. Ela possui um grupamento heme na sua estrutura e age principalmente em altas concentrações de  $H_2O_2$ , pois possui um Km elevado (AEBI, 1984).

O sistema da glutathiona mantém o equilíbrio redox da célula através das atividades das enzimas GPx, GR, e GST (BIRBEN et al., 2012). A GPx promove a redução do  $H_2O_2$  em água e oxigênio utilizando como substrato a glutathiona reduzida (GSH). Nesta reação, a glutathiona oxidada formada é reciclada pela enzima GR, que utiliza NADPH como cofator. A GST é uma enzima que age na detoxificação de agentes eletrofílicos através da utilização de GSH como cofator. Dessa forma, a reciclagem de GSH é crucial na manutenção do sistema de proteção celular, uma vez que baixas concentrações de GSH são indicativas de estresse oxidativo (SCHAFER; BUETTNER, 2001).

Além das defesas antioxidantes enzimáticas, a mucosa gastrointestinal conta com uma segunda linha de defesa não enzimática composta especialmente de GSH e o ácido ascórbico (vitamina C). A GSH é um tripeptídeo com alta capacidade doadora de elétrons devido ao grupamento tiol (-SH) na porção cisteína. A GSH atua como cofator das enzimas GST e GPx (MASELLA et al., 2005). O tecido gástrico glandular possui elevada concentração de GSH, o que resulta em uma proteção adicional para as células da mucosa devido aos efeitos do ácido clorídrico (BHATTACHARYYA et al., 2014). Outro antioxidante não enzimático importante é a vitamina C, encontrada em frutas e vegetais frescos. A vitamina C doa elétrons para outros compostos e previne sua oxidação além de atuar na regeneração da vitamina E ( $\alpha$ -tocoferol) (STOHS; BAGCHI, 1995). O  $\alpha$ -tocoferol é um antioxidante lipossolúvel que inibe a adesão de neutrófilos às células endoteliais e a produção de oxigênio em neutrófilos ativados em modelos de úlcera gástrica induzida por AINES e etanol (JAARIN et al., 2000; FESHARAKI et al., 2006).

#### 1.1.4.1.3 Úlcera gástrica e inflamação induzida pelo etanol

A resposta inflamatória é um fator inevitável na úlcera gástrica induzida pelo etanol (BALOGUN; DAMAZO; MARTINS, 2015). A inflamação gástrica é caracterizada pela migração de macrófagos e leucócitos polimorfonucleares na área da lesão. A infiltração dessas células promovem a liberação de mediadores pró-inflamatórios como o fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleucina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina-6 (IL-6) (LIANG et al., 2018). O TNF- $\alpha$  possui um papel muito importante para a UG, pois não só impede a microcirculação em torno da úlcera, mas também induz a ativação de fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B). Na clínica, estudos demonstraram que em pacientes com UG ocorre a ativação da via do NF- $\kappa$ B e subsequente produção de TNF- $\alpha$  e IL-8 (HAGHAZALI et al., 2011). O NF- $\kappa$ B consiste em um heterodímero constituído de duas subunidades p65 e p50 (HUNTER; DE PLAEN, 2014). Em condições basais, NF- $\kappa$ B é sequestrado no citoplasma e complexado com proteína inibitória I $\kappa$ B $\alpha$ . No entanto, a exposição a agentes estressores como o etanol, o TNF- $\alpha$  e a alta produção de EROs induzem a fosforilação de I $\kappa$ B $\alpha$ , o que permite a translocação do NF- $\kappa$ B para o núcleo onde ele regula a expressão de vários mediadores pró-inflamatórios incluindo TNF- $\alpha$ , IL-6, moléculas de adesão (ICAM1, MCP-1), proteína quimiotática de macrófagos, entre outros (KANG et al., 2014). Adicionalmente, estudos recentes indicam que a ativação do NF- $\kappa$ B está correlacionada com o envolvimento da via PI3K/AKT e o receptor *toll-like* 4 (TLR4) (POURRAJAB et al., 2015). A descoberta de TLR4 está atraindo muito a atenção devido ao seu papel em muitas doenças infecciosas e lesões inflamatórias (HUNTER; DE PLAEN, 2014).

Os mediadores pró-inflamatórios que atuam na resposta inflamatória também ativam a via de sinalização apoptótica (ZHENG et al., 2016). Estudos indicam que níveis elevados de EROS e de TNF- $\alpha$  aumentaram a apoptose no tecido gástrico (AL BATRAN et al., 2013). Isso porque proteínas pró-apoptóticas como Bax quando ativadas translocam-se para a mitocôndria onde alteram a permeabilidade da membrana, permitindo o extravazamento de proteínas pró-apoptóticas, tais como o citocromo-c, o fator indutor da apoptose, DNase e pró-caspases 2 e 9. Além disso, altos níveis de TNF- $\alpha$  estão associados a baixa expressão dos marcadores de proliferação celular (PCNA) responsáveis pela manutenção da integridade e reconstituição da mucosa gástrica (ZHENG et al., 2016).

#### 1.1.4.1.4 Terapêutica

Segundo a Federação Brasileira de Gastroenterologia, as indicações gerais para o tratamento de úlceras gástricas consistem em intervenções medicamentosas que têm por finalidade aumentar os fatores protetores locais da mucosa gástrica (secreção de muco, bicarbonato e prostaglandinas) ou diminuir os agentes agressores como infecções por *H. pylori*, ácido gástrico, pepsina, bile, e alguns medicamentos (FBG, 2015). A endoscopia é o exame amplamente utilizado para a confirmação da lesão, pois permite a visualização direta da mucosa gástrica, e ainda possibilita que uma biópsia possa ser coletada para testes de infecções por *H. pylori* ou neoplasia maligna (MALFERTHEINER; CHAN; MCCOLL, 2009).

Dentre os tratamentos farmacológicos propostos para a úlcera gástrica, os inibidores da bomba de prótons (IBPs) são os mais prescritos no mundo devido sua boa eficácia e baixa toxicidade (BRUZZI, 2008). Além do mais, são utilizados para a prevenção de recidivas, associada ao uso de AINES (KHALEEL et al., 2017). Os medicamentos dessa classe incluem o omeprazol, lansoprazol, pantoprazol, rabeprazol e esomeprazol. Outras classes de fármacos tais como antagonistas do receptor de histamina H<sub>2</sub> (cimetidina, ranitidina), anti-colinérgicos (M<sub>1</sub>) (pirenzepina), antiácidos (hidróxido de alumínio, trisilicato de magnésio), agentes citoprotetores (análogos de sucralfato e prostaglandina) e antimicrobianos para erradicação de *H. pylori* (amoxicilina, claritromicina) também são amplamente utilizados na clínica médica (AWAAD; EL-MELIGY; SOLIMAN, 2013).

Apesar do valor inquestionável das drogas sintéticas utilizadas na prevenção e no tratamento de úlceras gástricas, essas terapias não são altamente específicas e podem resultar em efeitos adversos graves. Dentre eles, os riscos de fratura óssea, deficiência de magnésio e de vitamina B<sub>12</sub>, e nefrite intersticial são bastante relatados (FREEDBERG; KIM; YANG, 2017; WILLIAMS; HYLAND, 2011). Além disso, medicamentos como os IBP e antagonistas do receptor de histamina quando utilizados cronicamente levam a supressão do ácido gástrico, o que pode resultar em hipergastrinemia (resultante da menor liberação de somatostatina, que ocorre subsequentemente à supressão da secreção ácida) e no aumento do risco de infecção entérica (principalmente por *H. pylori*), sendo que estes dois problemas podem levar ao surgimento de câncer gástrico (YUAN; PADOL; HUNT, 2006). Evidências de estudos em modelos celulares e animais indicam que os IBPs podem bloquear ATPases tipo V, resultando em aumento nos níveis cerebrais da proteína  $\beta$ -amilóide, uma proteína que quando acumulada predispõe doenças como Alzheimer (BADIOLA et al., 2013).



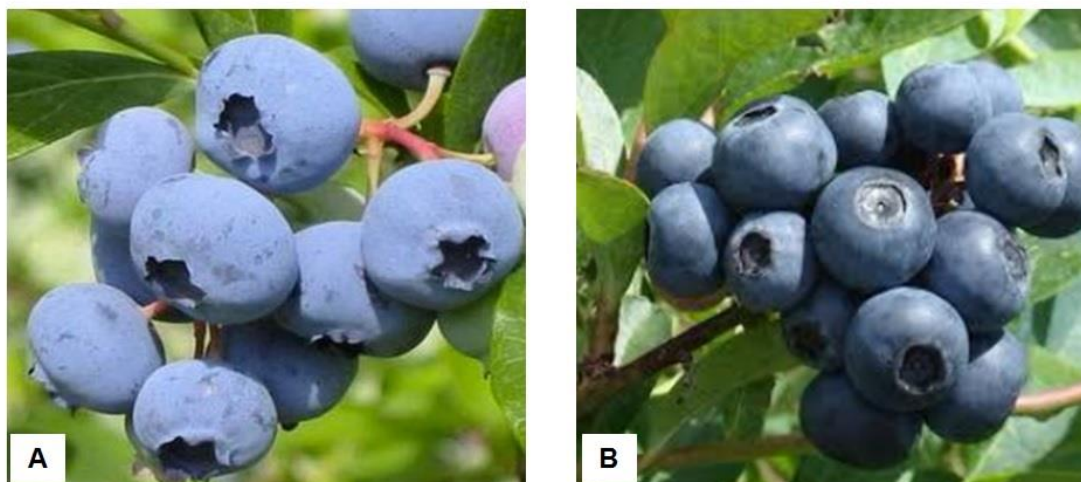
### 1.1.5 Mirtilo

O mirtilo (*Vaccinium sp.*) é um fruto nativo da América do Norte, membro da família Ericaceae, que além da importância comercial, vêm atraindo o interesse de pesquisadores quanto aos seus potenciais benefícios para a saúde (PERTUZATTI et al., 2012). É pertencente ao grupo de “pequenos frutos” e caracterizado pelo porte arbustivo da planta, medindo cerca de 1,5 a 4 metros de altura. O mirtilo é predominantemente cultivado em clima temperado, no entanto, o melhoramento genético facilitou a adaptação do fruto nos diferentes países onde é produzido (BIAN et al., 2014).

No Brasil, o início do cultivo foi na década de 80, apresentando atualmente uma produção significativa nas regiões Sudeste e o Sul do país (RASEIRA; ANTUNES, 2004). Devido a predominância do clima temperado, o Brasil apresenta forte potencial produtor durante todo o ano (KONDA, 2014). Dentre os grupos predominantemente produzidos e comercializados estão o Rabbiteye (*Vaccinium ashei* Reade, também conhecido como *Vaccinium virgatum* Aiton) e o Highbush (*Vaccinium corymbosum* L.) (Figura 4A e B) (PERTUZATTI et al., 2016). O grupo chamado “Rabbiteye” (olho de coelho), originário do sul da América do Norte, atualmente é o mais encontrado no Brasil (MORAES et al., 2007). Seus frutos apresentam vigor elevado com aparência exuberante e qualidade gustativa, porém o tamanho da fruta é inferior ao grupo “Highbush”. A forte adaptação deste grupo deve-se a baixa necessidade de horas de frio (300 a 650 h), o que explica sua produção em estados como Rio Grande do Sul e São Paulo. As cultivares do grupo Highbush são originárias da costa da América do Norte e seus frutos apresentam qualidades mais atraentes como tamanho maior da fruta, sabor e cor azulada (BROOKS; OLMO, 1997). Os mirtilos são pouco consumidos na forma in natura, porém possuem uma grande versatilidade, o que lhes confere uma ampla aplicação em geleias, sucos, assim como em produtos fermentados (OLIVEIRA; PANTE; SEREIA, 2015; PAYNE, 2005).

Geralmente, os frutos frescos apresentam uma ampla quantidade de nutrientes como minerais, carboidratos, água, proteínas e vitamínicos sendo também, uma boa fonte de fibras dietéticas (MICHALSKA; ŁYSIAK, 2015). Além disso, o mirtilo é considerado uma excelente fonte compostos bioativos, como os polifenóis (SHI et al., 2017; ZAFRA-STONE et al., 2007).

Figura 4: Mirtilo grupo rabbiteye (*Vaccinium ashei* R.) (A) e Mirtilo grupo highbush (*Vaccinium corymbosum* L.) (B).



Fonte: [www.abnativeplants.com](http://www.abnativeplants.com) (A); [www.embrapa.br/clima-temperado](http://www.embrapa.br/clima-temperado) (B).

#### *1.1.5.1 Métodos alternativos de extração de polifenóis: Solventes eutéticos profundos naturais*

Tradicionalmente, os métodos convencionais de extração de compostos fenólicos do mirtilo consistem na utilização de solventes orgânicos (SUN, 2008; BOCHI et al., 2014). Metanol, acetona e ácido fórmico são os solventes orgânicos mais utilizados (PERTUZATTI et al., 2016; RODRIGUEZ-SAONA; WROLSTAD, 2001). Entretanto, o uso destes solventes gera uma série de resíduos altamente tóxicos e que requerem estratégias de tratamento (KALIA et al., 2008). Somado a isso, necessitam de tecnologias de alto custo para o reduzir o impacto negativo na saúde e no meio ambiente (LOPES et al., 2000). Dessa forma, atualmente tem-se buscado metodologias que possam minimizar os problemas ambientais associados com a utilização de solventes orgânicos, bem como reduzir o custo e aumentar a segurança à saúde (BI; TIAN; ROW, 2013). As novas tecnologias biossustentáveis, chamadas tecnologias verdes buscam ativamente novos solventes para substituir os solventes orgânicos que apresentam toxicidade inerente e alta volatilidade, levando a evaporação destes compostos para a atmosfera (GU et al., 2014).

Recentemente, para atender as exigências de redução de custo de análise e de toxicidade dos solventes orgânicos, um novo grupo de solventes iônicos verdes tem emergido,

sendo conhecido como solvente eutético profundo natural (ou NADES - do inglês *natural deep eutectic solvents*) (DAI; SPRONSEN; WITKAMP, 2013). Em geral, os NADES são compostos de uma mistura formada por um receptor de hidrogênio (cloreto de colina (ChCl), normalmente) e um doador natural de hidrogênio (HBD, hydrogen-bond donor) (tais como aminoácidos, ácidos carboxílicos, açúcares, entre outros) (PAIVA et al., 2014). Esse tipo de solvente possui excelentes propriedades como baixa volatilidade à temperatura ambiente, inércia química, não são inflamáveis, possuem alta viscosidade, são de fácil preparação e não são prejudiciais ao meio ambiente. Além disso, tem sido relatada sua baixa toxicidade, a qual é dependente do organismo alvo e concentração (ESPINO et al., 2016; CVJETKO BUBALO et al., 2015; DAI et al., 2016; MORAIS; GONC, 2015; HAYYAN et al., 2013).

No entanto, algumas propriedades físico-químicas dos NADES, tais como a elevada viscosidade, podem reduzir a eficiência de extração dos compostos fenólicos (CVJETKO BUBALO et al., 2016). A viscosidade é uma das características mais importantes na aplicação dos solventes NADES. Em condições de viscosidade elevada, a transferência de massa é lenta, o que diminui a capacidade de extração (DAI; SPRONSEN; WITKAMP, 2013). Algumas abordagens podem solucionar este problema como adição de água ou o aumento da temperatura, quando os compostos bioativos em estudo não são termossensíveis (DAI et al., 2016a). Estudos indicam uma forte relação entre polaridade dos solventes NADES e a extração das antocianinas. Isto pode ser explicado pelo fato de solventes a base de ácidos orgânicos possuírem maior polaridade e desempenho de extração do que a base de açúcares e poliálcoois (DAI; SPRONSEN; WITKAMP, 2013; CVJETKO BUBALO et al., 2016). Outra propriedade importante para o sucesso na extração de compostos bioativos como as antocianinas é o pH do solvente. As antocianinas podem ser encontradas em diferentes formas químicas e, dependendo do pH podem estar altamente estáveis ou então na sua forma degradada (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Embora o interesse pela química verde tenha aumentado nas últimas décadas, os estudos que visam a utilização de solventes verdes na extração e determinação de compostos fenólicos ainda são escassos. Extratos de casca de uva obtidos com solventes eutéticos (ChCl contendo ácido oxálico e 25% de água) apresentaram um conteúdo de fenólicos 45% maior que aqueles obtidos usando solventes a base de metanol e água (CVJETKO BUBALO et al., 2016). Adicionalmente, solventes NADES a base de ChCl e ácido málico aumentaram em 25% a atividade antioxidante dos extratos de casca de uva (RADOŠEVIĆ et al., 2016). Esta mesma combinação de componentes NADES (ChCl e ácido málico) proporcionou uma extração mais efetiva de antocianinas de resíduos de vinhos tinto (BOSILJKOV; DUJMI,

2016). Além disso, um estudo recente revelou que a aplicação de NADES como diluente para a rutina aumentou a biodisponibilidade deste fitoquímico no plasma de camundongos (FAGGIAN et al., 2016). A utilização de NADES como veículo de administração têm se tornado atrativa no âmbito nutracêutico, pois além da biocompatibilidade (ZHAO et al., 2015), os componentes eutéticos são formados com ingredientes de grau alimentício (SUT et al., 2017).

#### *1.1.5.2 Antocianinas e compostos fenólicos não antociânicos*

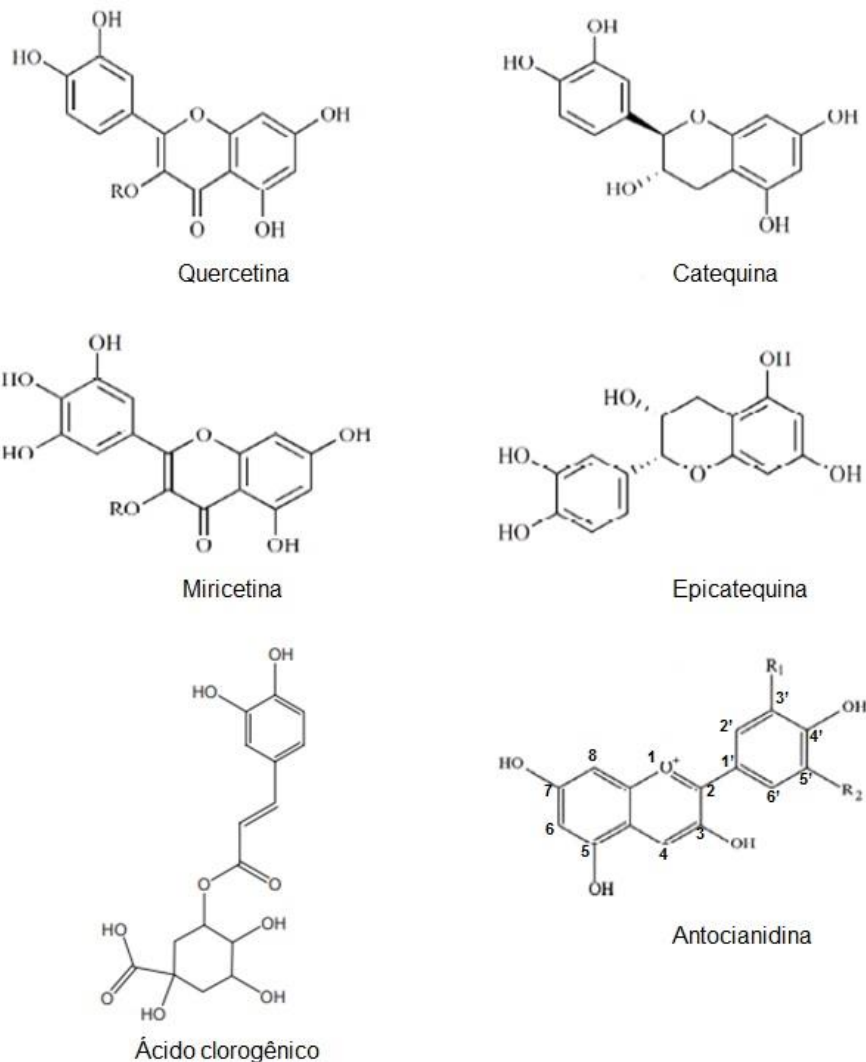
As antocianinas são metabólitos secundários das plantas, pertencentes a classe química dos flavonoides, os quais conferem grande capacidade antioxidante (Figura 5) (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009). Estes compostos são pigmentos importantes das plantas e diferem de uma variedade de compostos fenólicos quanto ao número de grupos hidroxilas, ao tipo e número de açúcares ligados a molécula e por fim, quanto ao número de ácidos alifáticos ou aromáticos ligados a moléculas de açúcar (KONG et al., 2003). As antocianinas são formadas por uma porção aglicona (antocianidina; Figura 5) e uma porção açúcar, que apresenta-se ligada nas posições C3 e C5 da molécula através de ligações glicosídicas. A glicosilação aumenta a estabilidade das antocianinas, sendo a forma mais comumente encontrada, enquanto as agliconas são raras na natureza devido a sua baixa estabilidade (HE; GIUSTI, 2010).

As antocianinas têm a propriedade de apresentar cores diferentes dependendo do pH do meio em que se encontram, além disso, o pH é um dos fatores que afetam a estabilidade das antocianinas (REIN, 2005). Em valores baixos de pH, o cátion flavilium é a espécie predominante e contribui para cores roxas e vermelhas, enquanto que em valores de pH entre 2 e 4 são encontradas espécies de azul quinoidal. Em valores de pH entre 4 e 6, quatro formas estruturais são encontradas: cátion flavilium, base quinoidal anidra, base de carbinol e chalcona. Nestas condições há um equilíbrio entre o cátion flavilium e as bases quinoidais e carbinol. Já em meios alcalinos com pH superior a 7, as antocianinas adquirem coloração amarela e são degradadas (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2009).

Nos mirtilos, as antocianinas são o grupo principal de fitoquímicos, o qual é considerado responsável por muitos benefícios para a saúde (HE; GIUSTI, 2010). Dentre as antocianinas encontradas no mirtilo predominam as que possuem delphinidina como aglicona, seguidas de malvidina, cianidina e peonidina (RODRÍGUEZ-MATEOS et al., 2011). Geralmente, estas agliconas apresentam-se glicosiladas com glicosídeos, galactosídeos e

arabinosídeos, no entanto, em algumas cultivares podem ocorrer alterações nas antocianinas (MÜLLER; SCHANTZ; RICHLING, 2012). A estrutura molecular e a concentração das antocianinas estão intimamente relacionadas com suas atividades biológicas (HUANG et al., 2016). Os mecanismos pelos quais as antocianinas exercem seus efeitos antioxidantes incluem vias diretas, pela remoção de ERs, ou indiretas através modulação da expressão de genes de defesa antioxidante (POJER et al., 2013).

Figura 5: Estrutura dos principais flavonoides encontrados no mirtilo. R1 e R2 na estruturadas antocianidinas podem ser H, OH, OCH<sub>3</sub> dependendo da aglicona.



Fonte: Adaptado de KONDA, 2014 e STEVENSON; SCALZO, 2012.

No entanto, para exercer qualquer atividade biológica, esses compostos bioativos devem estar biodisponíveis, isto é, ser absorvidos no intestino e transferidos para o local de ação, enquanto ainda mantêm a sua bioatividade (KAMILOGLU et al., 2015). Vários estudos demonstraram os efeitos benéficos da ingestão de antocianinas do mirtilo (POJER et al., 2013). O extrato de mirtilo contendo 1,43 mmol de antocianinas/kg aumentou a capacidade antioxidante no plasma de ratos saudáveis em 1,4 vezes, 3 h após a última refeição (TALAVÉRA et al., 2006). Além disso, as antocianinas presentes no extrato de mirtilo protegeram a mucosa intestinal do dano direto causado pela colite intestinal e reduziram marcadores inflamatórios como NO, MPO, IL-12, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  em modelo de colite induzida com TNBS em ratos (YU et al., 2011). Ademais, extratos de *Vaccinium myrtillus* L. ricos em antocianinas nas doses de 10-75  $\mu$ g de antocianinas monoméricas/mL inibiram o crescimento de células cancerígenas no cólon *in vitro* (ZHAO et al., 2004).

Além da alta concentração de antocianinas, o mirtilo também apresenta uma quantidade considerável de outros compostos fenólicos não antociânicos que vão desde ácidos fenólicos simples até taninos altamente polimerizados (BORGES et al., 2010). Assim como as antocianinas, os fenólicos não antociânicos são oriundos do metabolismo secundário das plantas e apresentam atividades biológicas muito importantes (EDIRISINGHE; BURTON-FREEMAN, 2016). Dentre os derivados hidroxicinâmicos, o ácido clorogênico é o ácido fenólico mais predominante nos mirtilos (BORGES et al., 2010). A maioria dos ácidos fenólicos apresenta-se na forma de glicosídeos e são altamente instáveis em meios alcalinos (ZADERNOWSKI; NACZK; NESTEROWICZ, 2005). Da classe dos flavonóis, os compostos quercetina, miricetina e kaempferol são comumente encontrados nos mirtilos (Figura 5) (KONDA, 2014). Os flavonóis e antocianinas fazem parte do mesmo grupo e seu potencial antioxidante está intimamente relacionado com o número e posição dos grupos hidroxila presentes em sua estrutura (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996).

No mirtilo, ainda são encontradas ainda as procianidinas. Estes compostos são também chamados de taninos condensados e são classificados de acordo com o seu grau de polimerização (GU et al., 2002). Na cultivar O'Neal, os dímeros de flavonóis representam aproximadamente 24% dos flavonóis, enquanto hexâmeros, monômeros e heptâmeros apresentam uma porcentagem média de 8,9% (RODRÍGUEZ-MATEOS et al., 2011). Contudo, o perfil de compostos fenólicos pode sofrer alterações em sua composição devido a inúmeras diferenças em suas variedades, as mudanças no estágio de maturação do fruto, bem como a fatores climáticos e agrônômicos (PERTUZATTI, 2009).

### 1.1.5.3 Polifenóis e seus benefícios no tratogastrointestinal

Atualmente, acredita-se que os polifenóis são os principais compostos naturais que promovem benefícios para a saúde (STEVENSON; SCALZO, 2012). Seus efeitos são geralmente atribuídos a sua capacidade antioxidante. Porém a absorção e biodisponibilidade destes compostos são fatores importantes para a elucidação dos seus potenciais benefícios. Sabe-se que apesar da presença de grandes quantidades de polifenóis no mirtilo, apenas uma porção muito pequena (5% a 10%) é realmente absorvida (CARDONA et al., 2013). Modelos de digestão *in vitro* indicam que compostos como as antocianinas e alguns ácidos fenólicos podem ser inicialmente absorvidos no estômago (MCGHIE; WALTON, 2007; TALAVÉRA et al., 2006; LAFAY et al., 2006). Além disso, simulações de digestão gástrica revelam que as antocianinas são estáveis durante este processo, o que indica que estes compostos podem permanecer por mais tempo no estômago e após passar para o colón, onde serão fermentadas (MCDOUGALL et al., 2005; CORREA-BETANZO et al., 2014; ZAFRA-STONE et al., 2007; TAGLIAZUCCHI et al., 2010). No TGI as antocianinas são expostas a diferentes condições de pH que podem afetar a sua biosponibilidade (MCGHIE; WALTON, 2007). No estômago, devido ao pH baixo, o cátion flavilium é a forma mais provável das antocianinas, enquanto o hemiacetal parece ser a forma predominante em órgãos como intestino e cólon (MCGHIE; WALTON, 2007; CLIFFORD; SCALBERT, 2000). Assim, considerando que a estabilidade dos compostos fenólicos foi confirmada na mucosa gástrica, a inclusão de compostos bioativos na dieta pode ser uma alternativa para prevenir ou minimizar lesões localizadas no estômago, como a úlcera gástrica.

O tratamento com extratos de mirtilo contendo 15 antocianinas diferentes apresentou efeito antioxidante e melhorou o fluxo sanguíneo, removendo assim o ácido que sofreu difusão através da camada de muco lesada, em modelo de úlcera gástrica em ratos (COLANTUONI et al., 1991). Adicionalmente, a administração oral do extrato da fruta de mirtilo nas doses de 30 e 100 mg/kg (*Vaccinium myrtillus* L. com 25% de antocianinas) protegeu a mucosa gástrica da erosão do tecido e infiltração leucocitária, além de reduzir os níveis de lipoperoxidação gástrica, e apresentar uma elevada capacidade de remoção do radical superóxido em um modelo de úlcera gástrica induzida por ácido clorídrico e etanol (OGAWA et al., 2011). Da mesma forma, a administração de extrato aquoso de sementes de mirtilo (25, 50 e 100 mg/kg, p.o.) protegeu a mucosa gástrica e a duodenal, atenuou a peroxidação lipídica, além de preservar as defesas antioxidantes em modelo de úlcera gástrica induzida por etanol (JABRI et al., 2016). Foi verificado ainda, em um estudo com extratos

metanólicos de mirtilo (*Vaccinium leschenaultii*) nas doses de 200 a 400 mg/kg uma proteção de 59,8 e 65,8% na formação de úlceras gástricas induzidas por etanol (NAGULSAMY; PONNUSAMY; THANGARAJ, 2015).

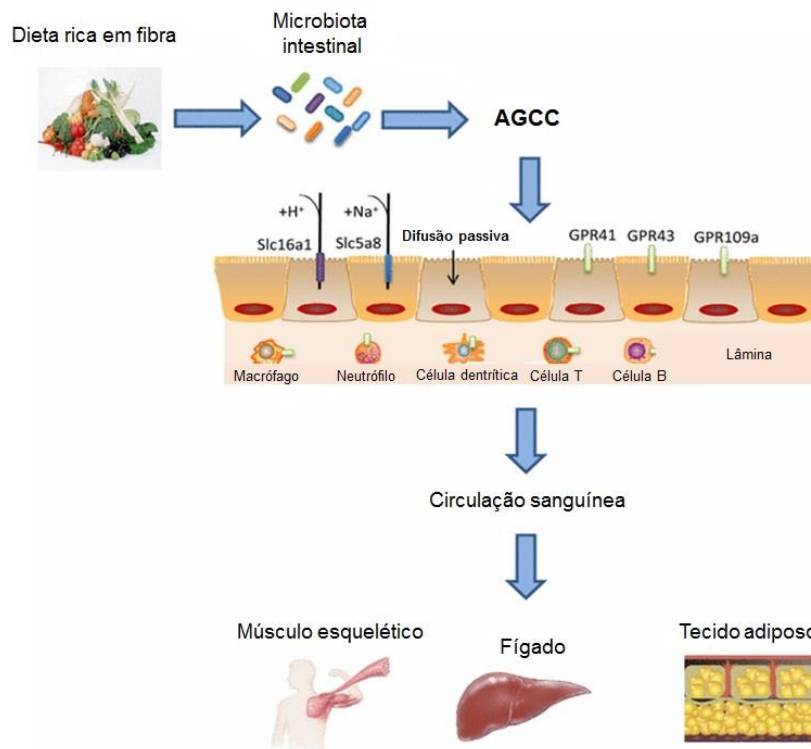
Além dos benefícios dos polifenóis no estômago, para um aumento da biodisponibilidade no organismo estes compostos passam por diversas transformações intestinais, incluindo ação das enzimas digestivas e metabolismo da microbiota intestinal (OZDAL et al., 2016). Após a passagem pelo estômago, o restante dos polifenóis são absorvidos no intestino delgado onde são submetidos a reações de oxidação, redução e hidrólise pelas enzimas de fase 1. Em seguida, são extensivamente biotransformados pelas enzimas de fase 2 nos eritrócitos e posteriormente nos hepatócitos. Estas reações resultam em uma série de metabólitos conjugados (derivados de metila, glucoroneto e sulfato) que são rapidamente liberados para a circulação sistêmica (DUDONNÉ et al., 2016). A microflora intestinal apresenta um papel crucial no metabolismo e degradação destes compostos. Aproximadamente 90% dos polifenóis não absorvidos acumulam-se no colón e são submetidos a degradação microbiana (CARDONA et al., 2013). Nesse processo, os polifenóis sofrem biotransformações enzimáticas incluindo a eliminação da porção glicosídica e hidrólise das formas agliconas dando origem a compostos bioativos mais estáveis, que são incorporados na corrente sanguínea e podem ser reabsorvidos (MARÍN et al., 2015). Além disso, os metabólitos produzidos pela microbiota podem modular a composição da flora intestinal através de efeitos prebióticos e atividades antimicrobianas contra bactérias patogênicas no intestino (MOCO; MARTIN; REZZI, 2012; MARÍN et al., 2015).

Além de influenciar no perfil e atividade metabólica, os produtos derivados produzidos pela microbiota fornecem nutrientes importantes para a manutenção do TGI, como os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) (SPANOGIANNOPOULOS et al., 2016). Os AGCCs têm atraído grande interesse científico devido aos vários benefícios a saúde, incluindo prevenção de inflamação intestinal, redução do risco de câncer de cólon, estimulação da saciedade e efeitos hipolipidêmicos (WONG et al., 2006; ARORA; SHARMA; FROST, 2011; HOSSEINI et al., 2011). Estes produtos são oriundos principalmente da fermentação microbiana de fibras dietéticas compostas por polissacarídeos e oligossacarídeos que não são digeridos pelas enzimas intrínsecas do estômago e intestino (MORRISON; PRESTON, 2016). As reações fermentativas produzem grupos de ácidos graxos com menos de seis carbonos, incluindo os ácidos fórmico (C1), acético (C2), propiônico (C3), butírico (C4) e valérico (C5). No intestino, os ácidos acético, propiônico e butírico representam cerca e 95% dos AGCCs (SUN et al., 2017).



Normalmente, os AGCC são absorvidos pela circulação sistêmica por difusão passiva; transporte mediado por transportadores Slc5a8 e Slc16a1; e via receptores GPR41, GPR43 e GPR109 (Figura 6). Após serem absorvidos, os AGCC são transportados para a veia porta hepática e distribuídos em tecidos como o músculo esquelético, fígado e tecido adiposo (SUN et al., 2017). Recentemente, um estudo demonstrou que os AGCC podem afetar de modo benéfico o transporte e o metabolismo dos polifenóis em modelo *in vitro* com células Caco-2, resultando em uma melhor absorção dos compostos bioativos (VAN RYMENANT et al., 2017). Além disso, os compostos fenólicos não absorvidos ao modularem a população microbiana no trato gastrointestinal podem afetar a produção de AGCC por fermentação bacteriana (LEE et al., 2006). Até o momento, os efeitos dos AGCC são mais estudados em disfunções intestinais localizadas, no entanto, existem fortes evidências de que os AGCC influenciam alguns processos moleculares em efeitos anti-inflamatórios a nível sistêmico (MCLOUGHLIN et al., 2017).

Figura 6: Formação, absorção e transformação dos AGCC.



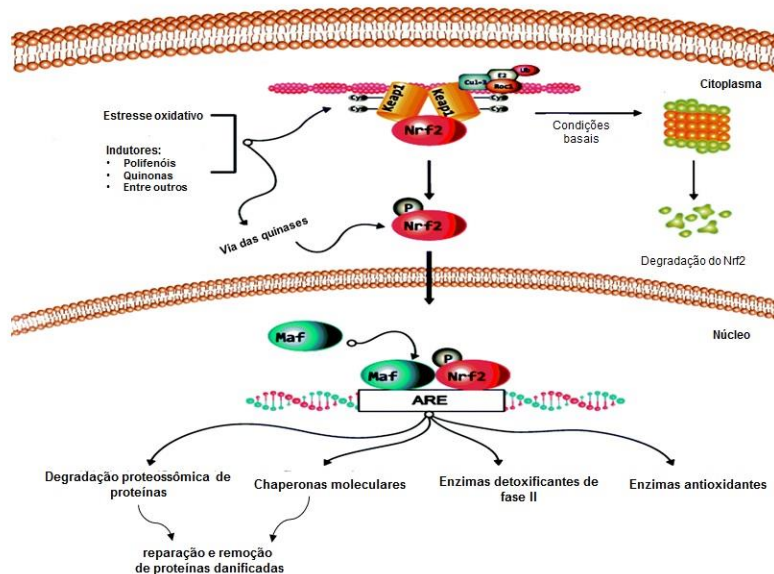
Fonte: Adaptado de SUN et al., 2017. Legenda: Agcc - ácidos graxos de cadeia curta; Gpr41 - receptores acoplados a proteína G 41; Gpr43 - receptores acoplados a proteína G 43; Gpr109a - receptores acoplados a

proteína G 109a; Slc5a8 - transportador de monocarboxilato acoplado ao sódio; Slc16a1 - família de veículo de soluto 16 (transportadores de ácido monocarboxílico), membro 1.

#### 1.1.5.4 Polifenóis e a via do Nrf2

Os mecanismos responsáveis pela ação antioxidante dos compostos fenólicos são complexos e estudos mais recentes evidenciam que na maioria dos casos eles estão mais relacionados a modulação da resposta antioxidante endógena do que a remoção direta de radicais livres. Uma das alternativas recentemente estudadas é a modulação da via do fator nuclear eritróide 2 relacionado ao fator 2 (Nrf2), que é a principal via envolvida na proteção celular contra o estresse oxidativo (SINGH et al., 2006)

Figura 7: Ilustração esquemática da regulação da via Nrf2 sob condições basais, de estresse e e via indutores.



Fonte: Adaptado de KUMAR et al., 2014. Legenda: Are - elementos de resposta antioxidante; Cys - resíduos sulfidrílica; Keap-1 - proteína associada ao citoesqueleto (do inglês *Kelch-like ECH-associated protein 1*); Nrf2 - fator nuclear eritróide-2; Maf - fibrosarcoma musculoponeurótico.

Em condições basais o Nrf2 é sequestrado no citoplasma pela proteína associada ao citoesqueleto, Keap-1 (KOBAYASHI; YAMAMOTO, 2006). Essa proteína atua como um regulador negativo do Nrf2, promovendo a sua ubiquitinação e degradação proteossômica (LEE; JOHNSON, 2004). A exposição a um estímulo de estresse oxidativo, resulta na

oxidação de resíduos de cisteína do Keap-1 e desligamento do Nrf2, que é translocado para o núcleo onde se liga aos elementos de resposta antioxidante (ARE) e se heterodimeriza com as pequenas proteínas Mafs (fibrosarcoma musculoaponeurótico) promovendo a transcrição de proteínas e enzimas antioxidantes/detoxificantes de fase II (HO-1, GPx, GST etc.) (LEE et al., 2012; KUMAR et al., 2014).

Alguns estudos revelam que compostos naturais como os polifenóis atuam na via de sinalização de proteínas quinases como PI3K/Akt, JNK e ERK2 em modelos de indução de úlcera gástrica com AINES (KIM et al., 2014; UPADHYAY; DIXIT, 2015). Essas proteínas quando fosforiladas favorecem a dissociação do Nrf2 da Keap-1, e ocorre a translocação do fator de transcrição para o núcleo onde se liga aos ARE ativando a transcrição de enzimas antioxidantes/detoxificantes (Figura 7) (LEE et al., 2013). No entanto, ainda não foram encontrados estudos avaliando os efeitos do extrato bruto de mirtilo e suas frações ricas em antocianinas e fenólicos não antociânicos sobre parâmetros moleculares como a via Nrf2, de estresse oxidativo e inflamatórios.

## 1.2 OBJETIVOS

### 1.2.1 Objetivo geral

Desenvolver um método de extração biossustentável através do uso de solvente eutético profundo natural, para a obtenção de polifenóis do mirtilo e avaliar a atividade biológica do extrato em modelo de úlcera gástrica em ratos.

### 1.2.2 Objetivos específicos

- Otimizar um método de extração baseado em NADES para antocianinas do mirtilo usando um planejamento experimental multivariado para encontrar a melhor razão molar dos componentes do solvente, e avaliar a atividade antioxidante *in vitro* das antocianinas do mirtilo extraídas com NADES;
- Avaliar o efeito do extrato bruto de mirtilo obtido através do solvente NADES e suas frações (ricas em compostos antociânicos e fenólicos não antociânicos) sobre marcadores de estresse oxidativo e inflamatórios, atividade de enzimas antioxidantes e lesões macroscópicas e histopatológicas do estômago em modelo de úlcera gástrica em ratos.

## 1.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 1.3.1 Local de desenvolvimento da pesquisa

Este trabalho foi desenvolvido no Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL) do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM.

### 1.3.2 Obtenção e composição nutricional das amostras

#### 1.3.2.1 Amostras de mirtilo

Para o primeiro estudo os frutos de mirtilo (*Vaccinium corymbosums*) foram obtidos de um produtor de frutas em Vacaria (Rio Grande do Sul, Brasil) como uma mistura das cultivares O'Neal e Florida (colheita 2014/2015). Posteriormente, para o experimento *in vivo*, frutos de mirtilo da cultivar O'Neal foram coletados em um pomar pertencente à Embrapa Clima Temperado em Pelotas, Rio Grande do Sul, em novembro de 2016. As frutas foram congeladas a -20°C, liofilizadas em um sistema Terroni®, modelo LS3000 (São Carlos, São Paulo, Brasil) e moídas até a obtenção um pó visualmente homogêneo. Em seguida, as frutas foram armazenadas -20°C em embalagens de alumínio até o final dos experimentos.

#### 1.3.2.2 Composição centesimal

A umidade, cinzas, pH, proteína, fibra solúvel, fibra insolúvel e acidez titulável do pó de mirtilo liofilizado foram determinadas de acordo com a Associação de Químicos Analíticos Oficiais (AOAC, 1995). Os lipídios totais foram extraídos com clorofórmio e metanol e quantificados por gravimetria (BLIGH; DYER, 1959). Os açúcares solúveis foram extraídos utilizando álcool etílico e determinados pelo ensaio de fenol-ácido sulfúrico (HALL, 2000). Os resultados foram expressos em g/100 g de pó de mirtilo liofilizado.

### 1.3.3 Extração de polifenóis do mirtilo utilizando NADES

#### 1.3.3.1 Preparação de NADES e características físico-químicas

Todos os produtos químicos foram previamente secos em estufa a 45°C durante 1 h antes da utilização. O cloreto de colina e os doadores de pontes de hidrogênio glicerol e ácido cítrico foram pesados e misturados nas proporções molares apresentadas na Tabela 1. Os três componentes foram escolhidos para desenvolver uma nova estratégia para a extração de antocianinas, uma vez que um estudo com misturas binárias de cloreto de colina e glicerol ou ácido cítrico demonstrou rendimentos iguais ou maiores que o solvente orgânico para antocianinas da casca de uva (JEONG et al., 2015). Em seguida, a mistura foi agitada a 80°C durante 30 min para produzir um líquido homogêneo (CVJETKO BUBALO, et al., 2015). Após, todas as soluções de NADES foram diluídas com 25% de água (v/v) para reduzir a viscosidade e facilitar a extração.

A densidade da mistura de NADES foi determinada de acordo com o método alternativo de balão volumétrico. O procedimento determinou a diferença entre a massa do balão volumétrico vazio e a massa do balão com a mistura NADES. Dessa forma, a densidade foi calculada pela razão entre a massa de mistura de NADES e seu volume correspondente.

O pH de NADES foi determinado através da utilização de um pHmetro previamente calibrado (Bel Engineering, W3B, Monza, Itália) com soluções padrão de pH 4,0 e 7,0.

A viscosidade da mistura NADES foi determinada a temperatura ambiente  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  utilizando um viscosímetro rotacional LVDV-II + Pro de Brookfield acoplado a um cilindro de medição SC4-25. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Tabela 1: Planejamento simplex centróide para a otimização da composição de NADES.

Ordem de execução	Variáveis independentes					
	Cloreto de colina ( $X_1$ )		Glicerol ( $X_2$ )		Ácido cítrico ( $X_3$ )	
	Valor codificado	Razão molar	Valor codificado	Razão molar	Valor codificado	Razão molar
1	1	3	0	0	0	0
3	0	0	0	0	1	3
5	0	0	1/2	1,5	1/2	1,5
7	1	1	1	1	1	1
9	1/6	0,5	2/3	2	1/6	0,5
2	0	0	1	3	0	0
4	1/2	1,5	1/2	1,5	0	0
6	0	0	1/2	1,5	1/2	1,5
8	2/3	2	1/6	0,5	1/6	0,5
10	1/6	0,5	1/6	0,5	2/3	2

### 1.3.3.2 Avaliação da eficiência de extração dos NADES pelo delineamento simplex-centróide

As diferentes composições de NADES foram investigadas para maximizar a extração de antocianinas totais. Neste estudo, o planejamento de misturas simplex-centróide foi escolhido devido sua utilidade em otimizar misturas de três componentes (ABDULLAH; CHIN, 2010). As diferentes condições testadas formam um triângulo, onde o vértice representa componentes puros (100% de cada componente NADES). Os pontos médios de cada lado representam uma mistura binária (1:1), o ponto central é uma mistura ternária (1:1:1), e os pontos axiais representam 2/3 de um dos componentes e 1/6 para os demais. Esse planejamento permite estudar todas as proporções de solventes possíveis (0-100%) usando um número reduzido de experimentos, além de avaliar um possível efeito de interação entre as variáveis (SCHEFFÉ, 1963).

O planejamento simplex-centróide foi composto por três componentes naturais ( $x_1$ =cloreto de colina,  $x_2$ =glicerol e  $x_3$ =ácido cítrico), três misturas binárias e quatro misturas ternárias. Este planejamento permite a avaliação de modelos lineares ( $b_1$ ,  $b_2$  e  $b_3$ ), quadráticos ( $b_{12}$ ,  $b_{13}$  e  $b_{23}$ ) e cúbico especiais ( $b_{123}$ ) (Eq. (1)) para a resposta em estudo.

$$Y = b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 \quad (1)$$

Todas as condições testadas são apresentadas na Tabela 1 e a resposta avaliada foi o teor de antocianinas expresso como equivalentes de cianidina-3-glicosídeo (mg de C-3-G 100 g de pó de mirtilo), que é a principal antocianina na maioria das frutas (HORBOWICZ et al., 2008). Neste ensaio, foram realizadas três replicatas independentes e analisadas em triplicata no ponto central.

O procedimento de extração foi realizado como descrito por Cvjetko Bubalo et al. (2016) com as seguintes modificações. A relação sólido-líquido foi 0,1 g de pó de mirtilo liofilizado para 5 mL de NADES e as amostras foram extraídas usando um banho ultra-sônico (40 kHz, 50 min) à temperatura ambiente. Posteriormente, os extratos foram centrifugados a  $2.100 \times g$  durante 15 min e o sobrenadante foi coletado e o volume ajustado para 5 mL.

### 1.3.3.3 Extração com solventes convencionais

A composição de NADES que produziu a resposta mais alta, ou seja, a concentração de antocianinas mais elevada foi fixada, e depois comparada com a eficiência de extração de

um solvente orgânico e de uma solução aquosa de ácido cítrico a 1% (m/v). A extração com solvente orgânico foi realizada de acordo com Pertuzatti et al. (2016) com as modificações descritas a seguir. A relação sólido-líquido foi de 0,1 g de pó de mirtilo misturado com 6 mL de metanol:água:ácido fórmico (50:48,5:1,5; v/v). Em seguida, a amostra foi submetida a um banho ultra-sônico (40 kHz, 2 min) e centrifugada a 1.200 x g durante 10 min. A amostra foi extraída uma vez. Este solvente também foi utilizado para uma extração exaustiva de modo a obter um conteúdo de aproximadamente 99% das antocianinas na amostra. A extração exaustiva foi realizada nas mesmas condições descritas acima, no entanto, neste procedimento a amostra foi submetida a quatro extrações sucessivas. Posteriormente, os extratos obtidos foram combinados em um único frasco âmbar.

O método de extração com água:ácido cítrico 1% (m/v) foi realizado de acordo com Ferreira (2017). A extração foi realizada misturando-se 0,1 g de pó de mirtilo e 12 mL deste solvente verde aquecendo-o em banho-maria em ebulição durante 5 min. Posteriormente, a amostra foi resfriada e filtrada.

#### *1.3.3.4 Extração em fase sólida (SPE)*

Os extratos foram purificados por extração em fase sólida (SPE) (cartucho de 1 g, 5 mL, Strata C18-E de Phenomenex, Torrance, EUA) de acordo com Rodriguez-Saona, e Wrolstad (2001), modificado por Bochi et al. (2015).

#### *1.3.3.5 Determinação da capacidade antioxidante*

A fração antociânica dos extratos obtidos (purificada por SPE) foi submetida a avaliação da capacidade de absorção de radicais de oxigênio (ensaio ORAC) de acordo com Ou; Hampsch-Woodill; Prior (2001) e de redução do ferro (teste de FRAP) pelo método de Benzie; Strain (1999). Os dados foram expressos como equivalentes de Trolox, um análogo hidrossolúvel da vitamina E.

#### *1.3.3.6 Análise de antocianinas por HPLC-MS/MS*

A fração de antocianina purificada foi filtrada (0,22 µm, filtros de seringa de PTFE, 25 mm, Analítica, SP, Brasil) e analisada usando um equipamento de HPLC (cromatografia líquida de alta performance, Shimadzu, Columbia, MD, EUA). A separação foi realizada

utilizando uma coluna de fase reversa (C18, 2,6  $\mu\text{m}$ , 100 mm x 4,6 mm, Phenomenex, Torrance, EUA) a 38°C. O programa LCMS Solution Software (Versão 3, Shimadzu) foi utilizado para análise de dados.

Os compostos foram separados por eluição com as seguintes fases móveis: solução ácida (3% v/v de ácido fórmico, 85%, Merck<sup>®</sup>) em água ultrapura (Milli-Q Gradient System, Millipore Corporation, Massachusetts, EUA) como fase A e acetonitrila pura (HPLC grade, Merck, Darmstadt, Alemanha) como fase B. O fluxo foi de 0,9 mL/min e o volume de injeção foi de 20  $\mu\text{L}$ . A separação foi obtida usando um gradiente de 8% de B por 5 min, depois de 8 para 32% de B, em 25 min, 90% de B (27 min) foi mantido até 37 min. A condição inicial foi restabelecida (8% de B) em 2 min (39 min) e a coluna foi condicionada durante 5 min antes da próxima injeção.

A quantificação de antocianinas por HPLC foi realizada em triplicata a 520 nm usando uma curva de calibração do padrão C-3-G. O método HPLC foi validado determinando a linearidade da curva de calibração, limite de detecção (LOD), limite de quantificação (LOQ) e precisão. A linearidade foi avaliada com base em uma curva de calibração de cinco pontos. O coeficiente de correlação para a curva de calibração foi superior a 0,99, indicando uma linearidade muito boa. O limite de detecção foi determinado como a quantidade de padrão exigida para fornecer uma relação sinal-ruído de 3, e o limite de quantificação foi determinado como a menor concentração dando uma relação sinal-ruído de 10. A precisão do método foi determinada em termos de repetibilidade intermediária da área do pico para o padrão, com desvio padrão relativo (DPR%) inferior a 0,96% e indicando o grau adequado de precisão.

A análise HPLC-MS/MS foi realizada em um espectrômetro de massas com analisador Q-TOF e fonte de ionização por eletrospray (ESI) (Bruker Daltonics, modelo micrOTOF-QIII, Bremen, Alemanha). As análises foram realizadas no modo íon negativo e os parâmetros MS foram definidos da seguinte forma: tensão capilar a -4000 V (negativo), temperatura do gás seco a 310°C, gás nebulizador a 29 psi, e vazão a 8 L/min. A tentativa de identificação das antocianinas foi baseada no tempo de retenção e na ordem de eluição na coluna de fase reversa, absorção máxima (UV-vis) e fragmentos MS característicos de cada composto.

#### **1.3.4 Experimento *in vivo***

O protocolo de estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Bem Estar Animal da UFSM (CEUA nº 3935111116).



#### *1.3.4.1 Local de desenvolvimento da pesquisa*

Este trabalho foi desenvolvido no Núcleo Integrado de Desenvolvimento em Análises Laboratoriais (NIDAL) do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da UFSM juntamente com a colaboração do Biotério setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia.

#### *1.3.4.2 Preparação do extrato bruto de mirtilo a base de NADES e isolamento das frações do extrato*

De acordo com os resultados apresentados no planejamento simplex centroide a mistura NADES que apresentou o maior rendimento na extração de antocianinas foi escolhida para a produção do extrato bruto de mirtilo. Assim, o solvente NADES foi preparado com cloreto de colina, glicerol e ácido cítrico na razão molar de 0,5:2:0,5 e o procedimento experimental de preparação do solvente foi realizado conforme descrito na seção 1.3.3.2.

Para a obtenção do extrato bruto (EB), as amostras de pó de mirtilos (1,2 kg) foram extraídas com 3 L de solvente NADES, conforme descrito anteriormente por Cvjetko Bubalo et al. (2016) com as modificações descritas na seção 1.3.3.2. O sobrenadante foi coletado, reajustado com NADES para um volume final de 3 L e em seguida foi liofilizado. A solução viscosa obtida foi diluída com água destilada (1:1, v/v) e a sua composição foi analisada por HPLC acoplado a um detector do tipo fotodiodo.

Para obter as frações ricas em antocianinas e, em fenólicos não antociânicos, o extrato bruto de mirtilo, obtido com solvente NADES foi submetido a uma extração em fase sólida (SPE) conforme descrito na seção 1.3.3.4. Os solventes orgânicos utilizados neste processo foram evaporados usando um evaporador rotativo (Bûchi-R3TM, Flawil, Suíça) a  $38 \pm 2^\circ\text{C}$  e ambas as frações foram ajustadas a um volume conhecido (2,5 mL) usando água acidificada (0,35%, v / v, ácido cítrico).

#### *1.3.4.3 Delineamento experimental*

##### *1.3.4.3.1 Ensaio piloto*

Primeiramente foi conduzido um ensaio piloto para determinação das doses de extrato de mirtilo e suas frações de compostos antociânicos e fenólicos não antociânicos a serem

administradas nos animais. Neste ensaio foram utilizados 9 ratos Wistar machos com peso entre 150 e 200 g divididos em 3 grupos (n=3/grupo).

Os animais foram tratados com ração comercial e água *ad libitum* e receberam durante 14 dias, via oral, doses de extrato bruto do mirtilo obtido com solvente NADES que forneciam 5, 10 e 15 mg de polifenóis totais por kg de peso corporal (p.c.). Após permanecerem em jejum por 12 h, os ratos receberam uma dose de etanol 75% (2 mL/kg), por gavagem, conforme descrito por Robert (1979) para a indução da úlcera gástrica. Decorrido o período de 1 h, os animais foram anestesiados com isoflurano via nasal, e eutanasiados por punção cardíaca. Foi coletado o tecido estomacal para análise macroscópica do índice de úlcera gástrica, análise histológica e análise de capacidade antioxidante não enzimática e enzimática.

#### 1.3.4.3.2 Ensaio definitivo

Foram utilizados um total de 56 ratos Wistar machos com peso entre 150 e 200 g. Os animais foram mantidos com ração comercial para ratos e água *ad libitum*, a temperatura ambiente controlada ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) com um ciclo claro/escuro de 12:12 horas durante todo o experimento.

Os animais foram divididos em sete grupos experimentais (n=8/grupo), que receberam tratamento diário com água, veículo, extrato de mirtilo, suas frações ou lansoprazol por gavagem (2 mL/kg de p. c.), durante 14 dias antes da indução de úlcera gástrica:

(I) Grupo controle (Controle): recebeu água destilada por gavagem por 14 dias e não foi submetido à indução de úlcera gástrica.

(II) Grupo água-etanol (Água-EtOH): recebeu água destilada por gavagem durante 14 dias antes da indução da úlcera gástrica com etanol.

(III) Grupo veículo-etanol (Veículo-EtOH): veículo recebido (solução de extratora NADES) por gavagem durante 14 dias antes da indução de úlcera gástrica com etanol.

(IV) Grupo extrato bruto de mirtilo-etanol (EB-EtOH): recebeu 10,0 mg/kg p.c. de extrato bruto de mirtilo por gavagem durante 14 dias antes da indução de úlcera gástrica com etanol.

(V) Grupo fração rica em antocianina-etanol (FRA-EtOH): recebeu 4,2 mg/kg p. c. da fração de mirtilo rica em antocianinas por gavagem durante 14 dias antes da indução de úlcera gástrica com etanol.

(VI) Grupo fração fenólica não antociânica-etanol (FPNA-EtOH): recebeu 5,8 mg/kg p.c. da fração de mirtilo rica em fenólicos não antociânicos por gavagem durante 14 dias antes da indução de úlcera gástrica.

(VII) Grupo lansoprazol-etanol (LAN-EtOH): recebeu 30 mg/kg p.c. de lansoprazol por gavagem por 14 dias antes da indução de úlcera gástrica.

Neste ensaio experimental não foi possível acrescentar grupos tratados somente com EB, FRA e FPRNA devido necessitar de um elevado número de animais e resultar no aumento do custo do estudo e incompatibilidade com o princípio ético universalmente aceito dos três R (redução, remanejamento, refinamento).

#### *1.3.4.4 Coleta do material biológico*

Completado o período de 14 dias, os animais ficaram em jejum durante 12 h após a última administração de extrato ou de veículo e as lesões gástricas foram induzidas conforme descrito na seção *1.3.4.3.1*. Em seguida, o estômago foi coletado para determinar o índice de lesão gástrica, análise histológica e avaliação de marcadores inflamatórios e de estresse oxidativo.

#### *1.3.4.5 Análises*

##### *1.3.4.5.1 Índice de úlcera gástrica*

Para a determinação do índice de úlcera gástrica foram feitas fotografias do estômago e estas foram analisadas usando software Image J, J 1.36b (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA) para cálculo da área da lesão (mm<sup>2</sup>) e área total da mucosa gástrica. O índice de úlcera foi calculada conforme descrito por Ganguly (1969) utilizando seguinte a fórmula:

$$\text{Índice de úlcera (IU)} = 10/X$$

Onde X = área mucosa total/área ulcerada total.

A percentagem de inibição foi calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$[(\text{IUGrupo Água-EtOH} - \text{IUGrupo Pré-tratado-EtOH})/(\text{IUGrupo Água-EtOH})] \times 100\%$$

#### 1.3.4.5.2 Análise histológica do estômago

Após as análises macroscópicas, porções do tecido estomacal dos animais foram fixadas em solução de formol tamponado 10%, processadas, embebidas em parafina e seccionadas a 6  $\mu\text{m}$ , sendo então coradas com hematoxilina e eosina. Duas lâminas de cada amostra foram preparadas e cada slide microscópico foi avaliado em 10 campos histológicos por dois operadores independentes em um método duplo-cego para detectar alterações. As amostras foram avaliadas quanto à integridade da mucosa gástrica, hiperemia e infiltração de neutrófilos conforme descrito por Bancroft e Stevens (1977).

#### 1.3.4.5.3 Análises bioquímicas

Imediatamente após a dicotomização das amostras para análise histológica, porções do estômago com 0,2 g cada foram homogeneizadas em 0,6 mL de solução salina tamponada com fosfato 0,01 M com NaCl 0,136 M (pH 7,4), em gelo usando um homogeneizador ultra-Turrax e centrifugadas a 4°C (5000 rpm, 10 min). Os sobrenadantes foram coletados e utilizados para ensaios bioquímicos.

#### 1.3.4.5.4 Marcadores de estresse oxidativo

Os produtos avançados de oxidação proteica (AOPP) foram determinados em 340 nm após solubilização dos lipídios com ácido cítrico (HANASAND et al., 2012). Os níveis de glutathiona reduzida (GSH) e glutathiona oxidada (GSSG) foram medidos pelo método fluorimétrico como descrito anteriormente por Hissin; Hilf (1976). Os níveis de nitrito e nitrato (NO<sub>x</sub>) foram avaliados usando vanádio (III) combinado com a detecção pela reação de Griess, de acordo com Miranda; Espey; Wink (2001).

#### 1.3.4.5.5 Marcador inflamatório

A atividade da mieloperoxidase (MPO) foi determinada no sobrenadante do estômago como descrito anteriormente por Grisham; Hernandez; Granger (1986) com algumas modificações. As amostras do sobrenadante do estômago foram misturadas com tampão de fosfato de potássio (50 mM, pH 6,0) e brometo de hexadeciltrimetilamônio (0,5%). A análise

cinética da MPO foi iniciada pela adição de peróxido de hidrogênio (0,005%) e avaliada em 450 nm a 25°C.

#### 1.3.4.5.6 Sistema de defesa antioxidante

A atividade da superóxido dismutase (Cu/Zn SOD) foi determinada por inibição da redução do nitro azul de tetrazólio (NBT) em 560 nm (SPITZ; OBERLEY, 1989). A atividade da GR foi determinada utilizando glutatona oxidada e NADPH em 340 nm (CARLBERG; MANNER, 1979). A atividade da GST foi medida a 340 nm, utilizando 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) como substrato (HABIG; PABST; JAKOBY, 1974). A atividade da GPx foi determinada utilizando glutatona reduzida, GR e NADPH. O método baseia-se na oxidação de NADPH, que é indicado por uma diminuição da absorvância em 340 nm (PAGLIA; VALENTINE, 1967).

#### 1.3.4.5.7 Expressão da proteína Nrf2

O tecido gástrico foi homogeneizado em tampão A (pH 7,9) gelado, contendo 50 mM de ácido hidroxietil piperazinoetanosulfônico (HEPES), 1 M de KCl, 1 M de MgCl<sub>2</sub>, 100 mM de ácido etilenodiamino tetra acético (EDTA), 200 mM de fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF), 100 µL de Triton X-100, 100 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> e 1 M de ditioneitol (DTT) e deixado em gelo durante 15 min. Em seguida, os lisados do tecido foram centrifugados a 15.000 *x g* a 4°C durante 30 min e os sobrenadantes foram recolhidos (fração citoplasmática). Os sedimentos da centrifugação anterior foram homogeneizados em tampão B (pH 7,9) gelado, contendo 50 mM de HEPES, 1 M de KCl, 1 M de MgCl<sub>2</sub>, 5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 200 mM de PMSF, 2,5% de glicerol, 100 µL de Triton X-100, 100 mM de Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> e 1 M de DTT. Após, as amostras foram sonicadas, centrifugadas a 15.000 *x g* a 4°C durante 30 min e o sobrenadante foi recolhido (fração nuclear). O teor de proteína foi determinado de acordo com Lowry et al. (1951). Amostras dos lisados (50 µg de proteína) foram resolvidos em gel SDS-PAGE de 12,5% (Nrf2 e β-actina citosólicas) ou SDS-PAGE a 7,5% (Nrf2 e lamin-B1 nucleares) e transferidos para membranas de nitrocelulose. Após o bloqueio da membrana (5% de leite em pó com baixo teor de gordura em TBS durante 1 h), as membranas foram incubadas durante a noite a 4°C com anticorpos primários para Nrf2 (1:1000; ab31163, Abcam, Cambridge, MA, EUA), para lamin-B1 (1:4000; 33-2000, ThermoFisher Scientific, MA, EUA) e β-actina (1:10000; ACTN05 (C4), ThermoFisher Scientific, MA, EUA).

Posteriormente, as membranas foram reveladas utilizando o sistema ECL (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e fotodocumentadas no ChemiDoc MP (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA). A intensidade das bandas foi quantificada com o software Quantity One (Bio-Rad, Hercules, CA, EUA) e normalizado para  $\beta$ -actina (fração citoplasmática) ou lamin-B1 (fração nuclear).

#### 1.3.4.5.8 Ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) nas fezes cecais

Os AGCC foram extraídos conforme Zhao; Nyman; Jonsson (2006) e analisados por cromatografia gasosa utilizando um cromatógrafo (Agilent 6890®, Estados Unidos) com detector de ionização em chama (DIC) e auto-injetor.

## 2 DESENVOLVIMENTO

### 2.1 MANUSCRITO 1

#### DEEP NATURAL EUTECTIC SOLVENTS AS A BIOCOMPATIBLE TOOL FOR THE EXTRACTION OF BLUEBERRY ANTHOCYANINS

Dariane Trivisiol da Silva, Roberson Pauletto, Sabrina da Silva Cavalheiro, Vivian Caetano Bochi, Eliseu Rodrigues, Cristiane de Bona da Silva, Milene Teixeira Barcia, Tatiana Emanuelli

Manuscrito submetido ao periódico:

*Food chemistry*

**Deep natural eutectic solvents as a biocompatible tool for the extraction  
of blueberry anthocyanins**

Dariane Trivisiol da Silva<sup>1</sup>, Roberson Pauletto<sup>3</sup>, Sabrina da Silva Cavalheiro<sup>2</sup>,  
Vivian Caetano Bochi<sup>4</sup>, Eliseu Rodrigues<sup>5</sup>, Cristiane de Bona da Silva<sup>6</sup>, Milene  
Teixeira Barcia<sup>3</sup>, Tatiana Emanuelli<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Center for Health Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>2</sup>Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>3</sup>Department of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>4</sup>Department of Nutrition, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil;

<sup>5</sup>Natural Antioxidants Laboratory, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil;

<sup>6</sup>Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil;

\*Corresponding author Tel.: +55 55 3220 8547; +55 55 3220 8353. E-mail address:

[tatiana.emanuelli@ufsm.br](mailto:tatiana.emanuelli@ufsm.br) (Tatiana Emanuelli).



**ABSTRACT**

The extraction of blueberry anthocyanins with natural deep eutectic solvents (NADES) based on choline chloride:glycerol:citric acid was optimized by simplex centroid design to find the best molar ratio for the solvent. Choline chloride:glycerol:citric acid at the molar ratio of 0.5:2:0.5 (NADES 9) was the optimal NADES for extraction. NADES 9 was as efficient as the conventional organic solvent (methanol:water:formic acid) when compared at the same sample:solvent ratio and yielded about 76% of blueberry anthocyanins compared to an exhaustive extraction with the organic solvent. NADES 9 yielded higher proportion of arabinoside anthocyanins and lower proportion of galactoside anthocyanins than the organic solvent. The antioxidant capacity (ORAC and FRAP assays) of the purified anthocyanin fraction obtained using NADES 9 was greater than or equal to the fractions extracted with organic solvent. Thus, NADES can be assumed as a cheaper substitute for organic solvents in the eco-friendly extraction of bioactive compounds from blueberry.

Keywords: eutectic solvents, blueberry, anthocyanins, extraction

## 1. Introduction

Bioactive compounds widely distributed in plants and fruits have aroused great interest in research because of their benefits in health promotion (Pertuzatti & Barcia 2015). The conventional methods for extracting these phytochemicals are based on the use of organic solvents such as mixtures containing water and ethanol, methanol or acetone (Bochi, Barcia, Rodrigues, Speroni, Giusti & Godoy, 2014). However, the use of these solvents generates a series of highly toxic waste that require treatment before disposal (Kalia, Sharma, Singh & Singh 2008; Lopes, Oliveira, Nagem & Pinto 2000). Thus, growing concerns about the environmental impact and the detrimental health effects of conventional solvents have increased legal requirements for workers' safety during the extraction process as well as the finished product (Radošević et al., 2016). In the last decades, the development of new ecological extraction alternatives are constantly being pursued (Cvjetko Bubalo, Vidović, Redovniković & Joki 2015).

Recently, a new green extraction technology known as the natural deep eutectic solvent (NADES) has emerged to meet the demands of biodegradability, sustainability, low toxicity and low cost (Dai, Van Spronsen, Witkamp, Verpoorte & Choi, 2013a). In general, NADES are composed of a mixture consisting of a hydrogen-bond acceptor (quaternary ammonium salt, choline chloride (ChCl)) and a natural hydrogen-bond donor such as amino acids, carboxylic acids, sugars, among others (Cvjetko Bubalo, Vidović, Radojčić Redovniković & Jokić, 2015). These mixtures of natural biocompatible compounds are characterized by intermolecular interactions, especially hydrogen bonds, which confer excellent physicochemical properties to NADES such as negligible volatility at room temperature, chemical inertia with water, nonflammability, and adjustable viscosity (Dai, Van Spronsen,

Witkamp, Verpoorte & Choi, 2013a). In addition, NADES are easy to prepare and exhibit high degree of solubility for different compounds due to their ability to form hydrogen bonds with these solutes (Mouden, Klinkhamer, Choi & Leiss, 2017).

Blueberry is a rich source of phenolic compounds, especially anthocyanins, which are pigments that impart salmon-pink, orange, red, violet, and blue colors (Sharma, Gupta, Singh, Bansal & Singh, 2016). Beyond their applicability as food color pigments, many health benefits of anthocyanins have been elucidated, mainly related to their antioxidant and anti-inflammatory activity in the prevention and treatment of metabolic disorders (Fernandes, Faria, Calhau, de Freitas & Mateus, 2014). Recent studies have revealed a promising potential of NADES solvent for extracting anthocyanins from grape skin, wine lees and *Catharanthus roseus* (Jeong et al., 2015; Bosiljkov et al., 2017; Dai, Rozema, Verpoorte & Choi, 2016). Binary NADES composed of ChCl:glycerol or ChCl:citric acid have been shown to be as effective as 80% methanol to extract anthocyanins from grape skin (Jeong et al., 2015). In addition, NADES were able to ensure the stability of the isolated anthocyanins, which discloses the potential of these solvents for food, pharmaceutical and cosmetic applications (Dai, Rozema, Verpoorte & Choi, 2016). Moreover, NADES have been recently shown to yield phenolic extracts of grape skin that have enhanced biological activity compared to an organic solvent (Radošević et al., 2016). However, the reason for this enhanced bioactive capacity remains to be determined.

The application of statistical methods to optimize the extraction of bioactive compounds is a useful tool to find an ideal extraction condition (Abdullah & Chin, 2010). The simplex centroid is a multivariate statistical method that allows to optimize the composition of mixture solvents for extracting target compounds (Bochi, Barcia,

Rodrigues, Speroni, Giusti & Godoy, 2014). In this context, the investigation of the interactions between sample matrix and solvent can be strong allies in the optimization of eco-friendly methodologies based on NADES.

Based on the aforementioned, the objective of this study was to optimize an extraction method based on ternary NADES for blueberry anthocyanins using experimental multivariate design to find the best solvent molar ratio. The extraction efficiency, anthocyanin profile and *in vitro* antioxidant activity of NADES extracted anthocyanins were characterized by comparison with conventional organic solvent and acidified water.

## **2. Materials and methods**

### *2.1. Chemicals and materials*

Methanol and formic acid were obtained from Qhemis (São Paulo, Brazil) and acetonitrile from J.T.Baker (Phillipsburg, New Jersey, USA). Choline chloride (ChCl) 98%, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid (Trolox<sup>®</sup>, 97%), 2,2'-azobis (2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), 2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ, 99%) and fluorescein disodium were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), glycerol (Belga, Parana, Brazil) and citric acid (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil).

### *2.2. Blueberry samples*

Blueberry fruits were obtained from a fruit producer in Vacaria (Rio Grande do Sul, Brazil) as a mixture of O'Neal and Florida cultivars (harvest 2014/2015). In this study, a total of 500 g of blueberry was used. Fruits were frozen at -20°C, lyophilized

in a Terroni®, model LS3000 (São Carlos, São Paulo, Brazil), and ground until obtaining a visually homogeneous powder.

Moisture, ash, pH, protein, soluble fiber, insoluble fiber, and titratable acidity of the lyophilized blueberry powder were determined according to the Association of Official Analytical Chemists (1995). Total lipids were extracted using chloroform and methanol and quantified by gravimetry (Bligh & Dyer, 1959). Soluble sugars were extracted using ethyl alcohol and determined by the phenol-sulfuric acid assay (Hall, 2000). The results were expressed as g/100 g of blueberry powder.

### *2.3. NADES preparation and physico-chemical characteristics*

All chemicals were dried in an oven at 45°C for 1 h before use. Choline chloride and the hydrogen bond donors glycerol and citric acid were weighed and mixed at the molar ratio shown in Table 1 to yield ternary NADES. These three components were chosen as binary mixtures of ChCl:glycerol and ChCl: citric acid have been shown to be effective to extract anthocyanins from grape skin (JEONG et al., 2015). Then, the mixture was stirred at 80°C for 30 min to yield a homogeneous liquid (Cvjetko Bubalo, Vidović, Radojčić Redovniković & Jokić, 2015). Thereafter, all NADES solutions were diluted with 25% water (v/v).

The density of NADES mixture was determined according to an alternative method of volumetric flask. The procedure determined the difference between the mass of the empty volumetric flask and the mass of the flask with the NADES mixture. Then, the density was calculated by reason between the mass of NADES mixture and its corresponding volume.

NADES pH was determined using a pH meter previously calibrated (Bel Engineering, W3B, Monza, Italy) with standard solutions pH 4.0 and 7.0.

The viscosity of mixtures were determined at room temperature  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  using a Brookfield rotational viscometer LVDV-II + Pro coupled to a measuring cylinder SC4-25. All analyses were performed in triplicate.

#### 2.4. Evaluation of NADES extraction efficiency by the simplex centroid design

Different proportions of NADES (**Table 1**) were investigated to maximize the extraction of total anthocyanins. In this study, the simplex-centroid mixture design was chosen because it is especially useful to optimize three-component mixtures (Abdullah & Chin, 2010). The different conditions tested form a triangle, where the vertex represents pure components (100% of each NADES solvent). Middle points in each side represent a binary mixture (1:1), the center point is a ternary mixture (1:1:1), and axial points represent 2/3 of one of the solvents and 1/6 for the others. This planning allows studying all solvent proportions (0–100%) by using a reduced number of experiment besides evaluating a possible interaction effect among variables (SCHEFFÉ, 1963).

The simplex-centroid design comprised three natural components ( $x_1$  = choline chloride,  $x_2$  = glycerol and  $x_3$  = citric acid), three binary mixtures and four ternary mixtures. This design allows the evaluation of linear ( $b_1$ ,  $b_2$ , and  $b_3$ ), quadratic ( $b_{12}$ ,  $b_{13}$ , and  $b_{23}$ ), and special cubic models ( $b_{123}$ ) (Eq. (1)) for the response under study.

$$Y = b_1X_1 + b_2X_2 + b_3X_3 + b_{12}X_1X_2 + b_{13}X_1X_3 + b_{23}X_2X_3 + b_{123}X_1X_2X_3 \quad (1)$$

All conditions tested are presented in Table 1 and the response evaluated was the anthocyanin content expressed as equivalents of cyanidin-3-glycoside (mg of cy-

3-glu/100 g of blueberry powder), which is the major anthocyanin in most fruits (Horbowicz, Kosson, Grzesiuk & Debski, 2008). Three independent replications were performed and analyzed in triplicate in the central point.

The extraction procedure was performed as described by Cvjetko Bubalo et al. (2016) with the following modifications. Solid-liquid ratio was 0.1 g of freeze-dried blueberry powder per 5 mL of NADES and samples were extracted using an ultrasonic bath (40 kHz, 50 min) at room temperature. Thereafter, extracts were centrifuged for 15 min at 2,100  $\times g$  and the supernatant was collected and the volume was adjusted to 5 mL.

#### *2.6. Extraction with conventional solvents*

The NADES composition that yielded the highest response was fixed and then compared with the extraction efficiency of an organic solvent and of an aqueous solution of 1% citric acid (v/w). The extraction with organic solvent was according to Pertuzatti et al., 2016 with the following modifications. The solid-liquid ratio was 0.1 g of blueberry powder mixed with 6 mL of a methanol:water:formic acid (50:48.5:1.5; v/v). Then, the sample was subjected to an ultrasonic bath (40 kHz, 2 min) and centrifuged for 10 min at 1,200  $\times g$ . The sample was re-extracted once. This solvent was also used for an exhaustive extraction in order to obtain a content of approximately 99% of the anthocyanins in the sample. The exhaustive extraction was carried out under the same conditions described above except that the sample submitted to four successive extractions and thereafter the extracts obtained were combined.

The method of extraction with water: citric acid 1% (v/w) was performed according to Ferreira (2017). The extraction was carried out by mixing 0.1 g of

blueberry powder and 12 mL of this green organic solvent and heating in a boiling water bath for 5 min. Thereafter, the sample was cooled and filtered.

### *2.7. Solid-phase extraction (SPE)*

Extracts were purified by solid-phase extraction (SPE) (1 g packed bed, 5 mL, Strata C18-E from Phenomenex; Torrance, USA) according to Rodriguez-Saona & Wrolstad (2001) modified by Bochi, Godoy & Giusti (2015). SPE columns were activated with 5 mL methanol and conditioned with three times of 5 mL acidified water (0.35% formic acid, v/v). Sample was applied and washed with a formic acid aqueous solution (0.35% v/v) to elute polar compounds such as sugars, acids, and other interfering substances. Thereafter, sample was washed with two volumes of ethyl acetate to remove less polar phenolic compounds. Finally, anthocyanins were eluted with a methanolic solution acidified with 0.1% formic acid (v/v). Anthocyanin fraction was concentrated in a rotary evaporator (Büchi-R3™, CE, CSA) at  $38 \pm 2^\circ\text{C}$  during 5 min, and reconstituted in final volume of 2 mL of acidified water (0.35% formic acid, v/v) for further analysis.

### *2.8. Determination of antioxidant capacity*

The antioxidant capacity of the anthocyanin-rich fraction obtained after SPE purification of the extracts was determined by assessing the oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and the ferric reducing antioxidant power (FRAP). Data were expressed as equivalents of Trolox antioxidant capacity (TEAC).

ORAC assay was carried out according to Ou, Hampsch-Woodill and Prior (2001). Fluorescence was assessed in a SpectraMax® M5e-HTRF plate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) with an excitation wavelength of 485 nm



and an emission wavelength of 520 nm at 1 min interval during 90 min using the software SoftMax® Pro.

FRAP assay was measured by the method of Benzie and Strain (1999) as the ability of sample to reduce ferric tripyridyltriazine ( $\text{Fe}^{3+}$ -TPTZ), which was assessed at 593 nm.

### 2.9. HPLC-MS<sup>n</sup> analysis

The purified anthocyanin fraction was filtered (0.22  $\mu\text{m}$ , PTFE syringe filters, 25 mm, Analitica, SP, Brazil) and analyzed using a HPLC equipment (high-performance liquid chromatography; Shimadzu, Columbia, MD, USA) coupled to a reverse phase Symmetry C-18 column (C18, 2.6  $\mu\text{m}$ , 100 mm x 4.6 mm, Phenomenex, Torrance, USA) at 38°C with diode array (DAD) and mass spectrometer (MS) detectors. LCMS Solution Software (Version 3, Shimadzu) was used for data analyses.

The solvent system was based on 3% (v/v) of formic acid in ultrapure water (Milli-Q Gradient System, Millipore Corporation, Massachusetts, EUA) as phase A and pure acetonitrile (HPLC grade, Merck, Darmstadt, Germany) as phase B. The flow rate was 0.9 mL/min and the injection volume was 20  $\mu\text{L}$ . The gradient was 8% of B for 5 min, then from 8% to 32% B, in 25 min, 90% of B (27 min) was kept until 37 min. Initial condition was re-established (8% of B) in 2 min (39 min) and column conditioned for 5 min prior to the next injection.

The quantification of anthocyanins by HPLC was performed in triplicate at 520 nm using a calibration curve of cy-3-glu standard. The HPLC method was validated by determining the linearity of calibration curve, limit of detection (LOD), limit of quantification (LOQ) and precision, as shown in **Supplementary material (Table 1)**.

Linearity was evaluated on the basis of an five-point calibration curve. Linear least-square regression analysis was used to calculate the slope, intercept and a correlation coefficient of the calibration curve. Correlation coefficient for the calibration curve was higher than 0.99, indicating very good linearity. The limit of detection was determined as the amount of standard required to give a signal-to-noise ratio of 3, and the limit of quantification was determined as the lowest concentration giving a signal-to-noise ratio of 10. The precision of the method was determined in terms of intraday repeatability of peak area for the standard, with relative standard deviation (RSD%) being lower than 0.96% and indicating the adequate degree of precision.

HPLC-MS<sup>n</sup> analysis was performed in a mass spectrometer with Q-TOF analyzer and electrospray ionization (ESI) source (Bruker Daltonics, model micrOTOF-QIII, Bremen, Germany). The analyses were performed in the negative ion mode and MS parameters were set as follows: capillary voltage at -4000 V (negative), dry gas temperature at 310°C, nebulizer gas at 29 psi, flow rate at 8 L min<sup>-1</sup>. The tentative identification of anthocyanins was based on the retention time and elution order in the reversed-phase column, UV-vis and MS spectra features.

### *2.10. Statistical analysis*

All experimental results were statistically analyzed using the Statistica V.7 software (Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA). Data were expressed as the mean and standard error ( $\pm$ SEM). Differences between means were analyzed by the ANOVA and Student's t test followed by the post hoc Tukey's test. A significant difference was considered at the level of  $P < 0.05$ . Pearson's correlation coefficients were used

to establish the relationship between monomeric anthocyanins content and antioxidant capacity (ORAC).

### **3. Results and discussion**

#### *3.1 Proximate composition of the lyophilized blueberry powder*

Blueberry is considered an important nutritional source of vitamins, carbohydrates, proteins, among others (Mauro, Guergoletto & Garcia, 2016). The lyophilized blueberry powder used in the present study had (g/100 g):  $16.0 \pm 0.7$  humidity and  $1.1 \pm 0.1$  ash. The lyophilized blueberry powder is a good source of proteins ( $3.2 \pm 0.1$ ), soluble and insoluble fibers ( $7.5 \pm 0.6$  and  $18.1 \pm 5.2$ ),  $48.8 \pm 2.3$  soluble sugars and 4.4% fat in comparison with fresh fruits. Regarding fruit quality indicators, the lyophilized blueberry powder had pH  $3.6 \pm 0.1$  and  $1.5\% \pm 0.3$  of titratable acidity (as w/w of malic acid). Data from the literature suggest that these values of pH and acidity are associated with a high fruit quality (Beaudry, 1992). As expected, the lyophilized powder of the blueberry showed high concentrations of nutrients such as protein, fiber, ashes and soluble sugars when compared to studies involving fresh fruits (Gündüz, Serçe & Hancock, 2015).

#### *3.2. Selection of NADES for the extraction of blueberry anthocyanins*

The extraction efficiency has attracted great interest in the last decades (Zainal-Abidin, Hayyan & Hayyan, 2017). The high demand for NADES use can be explained by its potential benefits as solvents (Bosiljkov et al., 2017). In addition to the environmental and economic benefits, the structure of NADES can be adjusted to optimize the extraction of bioactive compounds (Radošević et al., 2016). Thus, considering that the NADES solvent structure determines its physicochemical

properties and consequently its extraction efficiency, it is important to find an optimal NADES molar ratio for the extraction of phenolic compounds such as anthocyanins. In this study, ten NADES mixtures with different molar ratio of choline chloride:glycerol:citric acid were tested. The total content of anthocyanins extracted, which was assessed as equivalents of cy-3-glu, was the main response used for optimizing the extraction with NADES by planning centroid simplex (**Table 1**). Among the mixtures analyzed, choline chloride:glycerol:citric acid (ChCl:gly:citric acid) in the molar ratio of 0.5:2:0.5 (NADES 9) was the most promising, followed by NADES 3> NADES 7> NADES 1> NADES 8> NADES 4> NADES 6> NADES 5> NADES 10> NADES 2. The average content of cy-3-glu at the central points of the study, NADES (7), (8), (9) and (10) ranged from 36.47 to 73.12 mg/100 g of blueberry powder (**Table 1**) and their RSD values for the extraction in different days were 3.1, 9.0, 2.1 and 0.4%, respectively. These values are considered acceptable for the precision measurement of the tests (Horwitz & Albert, 1995). However, the application of the simplex centroid experimental design did not find an optimal point in the studied system and none of the models were significant (**Supplementary material, Table 2**). In this planning, there were no regions with very divergent responses and all the mixtures were effective to extract anthocyanins. These factors may have contributed for not finding an optimal point region in the response surface.

Since NADES mixtures of the central points of the planning had good extraction efficiency for blueberry anthocyanins assessed by HPLC, their extraction efficiency was compared with an organic solvent based on methanol:water:formic acid (**Fig. 1A**). The NADES 9 blend was as efficient as the organic solvent used as a reference to extract blueberry anthocyanins, whereas NADES 7 and 8 had lower extraction capacity and followed by NADES 10 that exhibited the lowest extraction

capacity ( $p < 0.05$ ; **Fig. 1A**). This difference can be explained by the chemical composition of NADES, which determine their physicochemical properties (Radošević et al., 2016). NADES mixtures based on organic acids have higher polarity than mixtures based on polyols and sugars (Dai, Witkamp, Verpoorte & Choi, 2013b). Solvent polarity can influence the extraction efficiency since more polar compounds, such as anthocyanins, obtained better extraction performance with eutectic solvents the base of organic acids, while the polyol and sugar mixtures had the extraction efficiency and polarity reduced by approximately 14% (Dai, Witkamp, Verpoorte & Choi, 2013b). Another important factor to take into consideration is the pH of the extracting solvent since anthocyanins can be found in different forms depending on the pH (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez & Galán-Vidal, 2009). In this study, NADES mixtures in all the central points of the planning contained citric acid, which yields a low pH favoring the stability of anthocyanins (Bosiljkov et al., 2017). NADES 9, which had the highest extraction efficiency for anthocyanins, had pH 1.17 (**Supplementary material, Table 3**) In acid environments, the stability of anthocyanins is favored because of the predominance of the flavilium ion, while at  $pH > 2$ , the binding structures around the flavilium ion change to form blue quinoid species. At pH values between 5 and 6, the forms are converted into pseudobase species of carbinol and chalcone and under alkaline conditions  $pH > 7$ , anthocyanins are highly susceptible to degradation (Castañeda-Ovando, Pacheco-Hernández, Páez-Hernández, Rodríguez & Galán-Vidal, 2009).

The high viscosity of sugar-based NADES along with low water content allows the formation molecular interactions that may result in the stabilization of the extracted bioactive compounds (Dai, Verpoorte & Choi, 2014). However, viscosity

may be a disadvantage, since it may reduce the solvent extraction efficiency (Bi, Tian & Row, 2013). Very high viscosities hamper the interaction of the sample with the NADES mixture, since extensive hydrogen bonds may restrict the mobility of the free species within the solvent, resulting in slow mass transfer (Dai, Witkamp, Verpoorte & Choi, 2013b, Zainal-Abidin, Hayyan, Hayyan & Jayakumar, 2017). However, this problem can be easily adjusted by adding a certain amount of water and increasing the temperature of the solvent (Dai, Van Spronsen, Witkamp, Verpoorte & Choi, 2013a). Generally, all NADES are diluted in water prior to use, however, the water content added in NADES should be made with caution, since a large amount of water in this solvent can break the supramolecular complex structure of NADES (Gutierrez, Ferrer, Mateo & del Monte, 2009). In this work, it was not possible to reduce the viscosity by the temperature increase, because in these conditions anthocyanins are converted to their chalcone form, which are more prone to degradation (Roobha, Saravanakumar, Aravindhana & Devi, 2011). Thus, based on previous tests, the water content chosen for this work was 25% (v/v) due to its ability to increase fruit anthocyanin extraction efficiency by 15% (data not shown).

Cvjetko Bubalo and colleagues (2016) also obtained satisfactory extraction yield for phenolic compounds from grapes by adding 25% water in choline-based NADES mixtures: ChCl:oxalic acid (1:1) and ChCl:malic acid (1.5:1). NADES mixtures with a water content higher than 25% (v/v) are usually applied to less polar mixtures, such as polyols and sugars. On the other hand, mixtures of organic acids have high polarity, and the addition of excess water implies in weakening the bonds between NADES and target compounds (Bosiljkov et al., 2017). In view of this, it is noted that the ability of NADES to extract phenolic compounds can change according to the water content, viscosity and polarity of the solvent, as well as the type of

phenolic compound and the matrix to which they are associated (Dai, Witkamp, Verpoorte & Choi 2013b, Bubalo, C'urko, Tomašević Ganic' & Redovnikovic, 2016).

### *3.3. Comparison of NADES extraction potential and different extraction solvents*

Based on the comparison of the extraction efficiency of NADES mixtures, NADES 9 was the most promising and thus it was selected for subsequent analyses. The efficiency of NADES 9 mixture for extracting blueberry anthocyanins was compared with different solvents at the same solid/liquid ratio (0.1 g of blueberry powder/12 mL solvent) and with an exhaustive extraction using organic solvent (0.1 g of blueberry powder/24 mL solvent), which is expected to yield maximal anthocyanin extraction (**Fig. 1B**). Methanol:water:3% formic acid was selected as the reference solvent for exhaustive extraction due to its high yield of anthocyanins, as previously demonstrated (Pertuzatti et al., 2016; Dai, Rozema, Verpoorte & Choi, 2016). The mixture water:1% citric acid is also a green extraction methodology that combines low toxicity, low cost and the conservative effect of citric acid in the extract itself (Lee & Wrolstad, 2004). The results obtained revealed that extraction with NADES 9 yielded about 76% of the anthocyanin content compared to the exhaustive extraction with organic solvent ( $p < 0.05$ ) but the extraction yield was similar to the organic solvent when compared at the same solid-liquid ratio (0.1 g/12 mL) (non-exhaustive extraction) (**Fig. 1B**). Water: citric acid 1% had lower extraction efficiency compared to NADES 9 and the organic solvent (**Fig. 1B**). The similar extraction capacity of organic solvent and NADES 9 is an encouraging result in green chemistry. Organic solvents commonly used to extract anthocyanins are highly corrosive and toxic and thus, the replacement of organic solvents with deep eutectic solvents has become attractive (Dai, Rozema, Verpoorte & Choi, 2016). The potential of the NADES 9

mixture for extracting the total content of monomeric anthocyanins from blueberry powder was evaluated by using an exhaustive extraction procedure (0.1 g of blueberry powder/24 mL of solvent). The extraction capacity of NADES 9 did not differ from the organic solvent when the exhaustive method was used for both solvents (total anthocyanin yield:  $599.4 \pm 65.3$  vs.  $617.7 \pm 17.2$  mg equivalents of cy-3-glu/100 g blueberry powder, respectively). These results indicate a promising potential of the NADES 9 mixture, since it extracts a significant amount of anthocyanins in a biocompatible, economical and safe manner, without purification steps (Dai, Van Spronsen, Witkamp, Verpoorte & Choi, 2013a). Based on data obtained, it can be assumed that NADES 9 is a possible substitute for the organic solvents for extracting anthocyanins from blueberry.

These results also become interesting when the cost of production of each solvent is taken into account (**Table 2**). Among the solvents studied, the NADES 9 mixture has a significantly reduced cost when compared to the organic solvent (methanol:water:formic acid), which besides presenting high cost requires extra treatment, such as disposal and recycling techniques (Zainal-Abidin, Hayyan, Hayyan & Jayakumar, 2017). The water:1% citric acid is the most economical solvent. However, it has reduced extraction efficiency for anthocyanins compared to the NADES 9 mixture.

The composition of the purified anthocyanin fraction extracted using organic solvent, NADES, and water:1% citric acid were elucidated by HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> (**Supplementary material, Fig. 1A, B and C**). Anthocyanins were identified based on their characteristic UV-vis and MS<sup>n</sup> spectral data (**Table 3**). Six anthocyanins were identified in the purified fractions of blueberry extracts being malvidin-3-galactoside > delphinidin-3-galactoside ~ malvidin-3-arabinoside > petunidin-3-glucoside ~



delphinidin-3-arabinoside > petunidin-3-arabinoside (**Table 3**). These anthocyanins amounted to ~92% of all anthocyanins detected in the extracts obtained using organic solvent and NADES 9 and to ~86% of all anthocyanins detected in the extracts obtained using water:1% citric acid. Although the extracts obtained using NADES 9 and organic solvent (non-exhaustive extraction) had higher total anthocyanin content than the extract obtained using water:1% citric acid (**Fig. 1B**), the profile of anthocyanins was similar among the different extraction solvents. Nevertheless, it is noteworthy that NADES 9 extraction yielded higher proportion of arabinoside anthocyanins (35.4% vs. 30.2% for the organic solvent) and lower proportion of galactoside and glucoside anthocyanins (44.5 and 11.8% vs. 47.9 and 14.7% for the organic solvent) than the organic solvent. Thus, we demonstrated for the first time that a choline-based ternary NADES yields anthocyanin extracts that are richer in arabinoside anthocyanins than those obtained using organic solvent.

#### *3.4. Antioxidant activity of anthocyanin-rich fractions from blueberry*

Besides being a good source of polyphenols, blueberry has been extensively studied because of its antioxidant capacity that has surpassed another 42 types of fruits and vegetables evaluated (Rocha Concenço, Stringheta, Ramos, Oliveira & Hiroshi, 2014). The antioxidant activity of the purified fractions of anthocyanins extracted using the conventional organic solvent, water:1% citric acid or NADES 9 were compared by assessing their capacity to remove oxygen radicals (ORAC assay) or to reduce ferric iron (FRAP assay) (**Table 4**). It is noteworthy, that the extraction solvents were removed during the purification (SPE) of the anthocyanin fraction. Thus, the antioxidant capacity assessed was not affected by NADES-forming compounds and could be solely associated to the extracted anthocyanins. The

ORAC values of the purified anthocyanin fractions extracted using NADES 9 solvent were significantly higher than the fractions obtained using the other solvents. The anthocyanin-rich fractions obtained using methanol:water:3% formic acid or water:1% citric acid had similar capacity to scavenge oxygen radicals. In binary eutectic mixtures containing choline chloride:malic acid (1:1), ORAC values obtained for crude extract from grape skin were 25% higher compared to mixtures based in choline chloride and polyols (fructose, xylose, glucose, and glycerol) (Radošević et al., 2016). In contrast, the capacity to reduce ferric ions (FRAP assay) was similar for the fractions of anthocyanins obtained using NADES 9 and methanol:water:3% formic acid, whereas the anthocyanin fraction extracted with water:1% citric acid had lower ferric reducing capacity.

There ORAC and FRAP values were positively correlated to the anthocyanin content in the purified fractions of the blueberry extract ( $r^2= 0.64$ ,  $p<0.05$ ;  $r^2= 0.79$ ,  $p<0.05$ , **Fig. 2A** and **B**, respectively). However, the highest oxygen scavenging capacity of NADES 9 extracts cannot be explained by their anthocyanin content, which was similar to the extracts obtained using the conventional organic solvent and only slightly higher than the extract obtained using water:1% citric acid (**Fig. 1B**). The aglycone pattern and the sugar moieties can synergistically influence the peroxy radical scavenging activity of the anthocyanins (Bors, Heller, Michel & Saran, 1990). A recent study aimed to elucidate the relationship between structure and antioxidant capacity of blueberry anthocyanins revealed that the ORAC scavenging capacity of malvidin-3-arabinoside was 1.5-times higher than malvidin-3-galactoside and 9.3-times higher than malvidin-3-glucoside (Chorfa, Savard & Belkacemi, 2016). Thus, the highest ORAC activity of NADES 9 extract is likely explained by its higher efficiency to extract arabinoside anthocyanins and lower efficiency to extract

glucoside and galactoside anthocyanins when compared to the organic solvent. In contrast, the ferric reducing capacity is more closely associated to the total anthocyanin content of the extracts ( $r^2= 0.79$ ) and the higher FRAP values of the extracts obtained using NADES 9 and organic solvent were parallel to their higher content of anthocyanins when compared to the water: citric acid solvent.

#### **4. Conclusion**

Among the NADES mixtures tested, the proportion of choline chloride: glycerol: citric acid at the molar ratio 0.5:2:0.5 (NADES 9) was the most efficient. This blend used at a sample: solvent ratio of 0.1:12 (w/v) showed an extraction yield of 76% when compared to an exhaustive extraction using conventional organic solvent (0.1:24, w/v, sample: solvent ratio) and had similar efficiency to the organic solvent when compared at the same sample: solvent ratio. In addition, the purified anthocyanin fraction obtained from blueberry using NADES 9 showed higher percentage of arabinoside anthocyanins and improved antioxidant activity compared to other solvents. This study reveals that NADES solvents are an alternative for obtaining economical and biocompatible extracts selectively enriched in anthocyanins that bear higher antioxidant activity.

#### **5. Acknowledgements**

The study was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) under grant [303654/2017-1] and by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) under grant [Edital Capes 27/2010 - Pró-Equipamentos Institucional]. Authors are thankful to Dr. Juliano Barin for the kind donation of choline chloride.

## 6. References:

- Abdullah, N., & Chin, N. L. (2010). Simplex-centroid mixture formulation for optimized composting of kitchen waste. *Bioresource Technology*, 101(21), 8205–8210.
- AOAC. (2005). Official methods of analysis. (18th ed.). Washington: Association of Official Analytical Chemists. (V. Arlington, Ed.) (16th ed.).
- Benzie, I. F., & Strain, J. J. (1999). Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. *Methods Enzymology*, 299, 15-27.
- Bi, W., Tian, M., & Row K.H., 2013. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. *Journal of Chromatography A*, 1285, 22–30.
- Bligh, E. G., & Dier, W. J. (1959). A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37, 911–917.
- Bochi, V. C., Barcia, M. T., Rodrigues, D., Speroni, C. S., Giusti M. M., & Godoy, H. T. (2014). Polyphenol extraction optimisation from Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. *Food Chemistry*, 164, 347–354.
- Bochi, V. C., Godoy, H. T., & Giusti, M. M. (2015). Anthocyanin and other phenolic compounds in Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) fruits. *Food chemistry*, 176, 234–43.
- Bors, W., Heller, W., Michel, C., & Saran, M. (1990). Flavonoids as antioxidants: Determination of radical-scavenging efficiencies. *Methods in Enzymology*, 186(C), 343–355.
- Bosiljkov, T., Dujmić, F., Bubalo, M. C., Hribar, J., Vidrih, R., Brnčić, M., Zlatic, E., Redovniković, I.R., & Jokić, S.(2017) Natural deep eutectic solvents and

- ultrasound-assisted extraction: green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. *Food and Bioproducts Processing*, 102, 195-203.
- Cvjetko Bubalo, M., C´urko, N., Tomašević, M., Ganić, K. K., & Redovniković, I. R. (2016). Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 200, 159–166.
- Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Redovniković, I. R., & Jokić, S. (2015). Green solvents for green technologies. *Journal of Chemistry Technology and Biotechnology*, 90, 1631–1639.
- Castañeda-Ovando, A., Pacheco-Hernández, Ma. de L. Ma., Páez-Hernández, E., Rodríguez, J. A., & Galán-Vidal, C. A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859–871.
- Chorfa, N., Savard, S., & Belkacemi, K. (2016). An efficient method for high-purity anthocyanin isomers isolation from wild blueberries and their radical scavenging activity. *Food Chemistry*, 197, 1226–1234.
- Dai, Y., Rozema, E., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2016). Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of anthocyanins from *Catharanthus roseus* with high extractability and stability replacing conventional organic solvents. *Journal of Chromatography A*, 1434, 50–56.
- Dai, Y., Van Spronsen, J., Witkamp, G., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013a). Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. *Analytica Chimica Acta*, 766, 61–68.
- Dai, Y., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2014). Natural deep eutectic solvents providing enhanced stability of natural colorants from safflower (*Carthamus tinctorius*). *Food Chemistry*, 159, 116–121.

- Dai, Y., Witkamp, G. J., Verpoorte, R., & Choi, Y. H. (2013b). Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius* L.. *Analytical Chemistry*, 85, 6272-6278.
- Fernandes, I., Faria, A., Calhau, C., de Freitas, V., & Mateus, N. (2014). Bioavailability of anthocyanins and derivatives. *Journal of Functional Foods*, 7(1), 54–66.
- Ferreira, L. F. Optimization aqueous extraction of polyphenols from blueberry bagasse and waste of winemaking. [s1]. Universidade Federal de Santa Maria, 2017.
- Gündüz, K., Serçe, S., & Hancock, J. (2015). Variation among highbush and rabbiteye cultivars of blueberry for fruit quality and phytochemical characteristics. *Journal of Food Composition and Analysis*, 38: 69-79.
- Gutierrez, M. C., Ferrer, M. L., Mateo, C. R., & del Monte, F. (2009). Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: A suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures. *Langmuir*, 25, 5509–5515.
- Hall, M. B. (2000). Neutral detergent-soluble carbohydrates Nutritional relevance and Analysis. A Laboratory Manual. Bolletin 339. University of Florida Extension Institute of Food and Agricultural Sciences.
- Horbowicz, M., Kosson, R., Grzesiuk, A., & Debski, H. (2008). Anthocyanins of fruits and vegetables-their occurrence, analysis and role in human nutrition. *Vegetable Crops Research Bulletin*, 68(1), 5-22.
- Horwitz, W., & Albert, R. (1995). Precision in analytical measurements: Expected values and consequences in geochemical analyses. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry*, 351, 507–513.
- Jeong, K. M., Zhao, J., Jin, Y., Heo, S. R., Han, S. Y., Yoo, D. E., & Lee, J. (2015).

- Highly efficient extraction of anthocyanins from grape skin using deep eutectic solvents as green and tunable media. *Archives of Pharmacal Research*, 38(12), 2143–2152. <https://doi.org/10.1007/s12272-015-0678-4>
- Kalia, K., Sharma, K., Singh, H. P., & Singh, B. (2008). Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lodd. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10129-10134.
- Lee, J., & Wrolstad, R. E. (2004). Extraction of anthocyanins and polyphenolics from blueberry processing waste. *Journal of Food Science*, 69(7),564-573.
- Mauro, C. S. I., Guergoletto, K. B., & Garcia, S. (2016) Development of Blueberry and Carrot Juice Blend Fermented by *Lactobacillus reuteri* LR92. *Beverages*, 2(4), 37.
- Mouden, S., Klinkhamer, P. G. L., Choi, Y. H., & Leiss, K. A. (2017). Towards eco-friendly crop protection: natural deep eutectic solvents and defensive secondary metabolites. *Phytochemistry Reviews*, 16(5), 935–951.
- Ou, B., Hampsch-Woodall, M., & Prior, R.L. (2001). Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 4619-4626.
- Pertuzatti, P. B., & Barcia, M. T. (2015). Biotransformation in Temperate Climate Fruit: A Focus on Berries. *American Journal of Food Science and Technology*, 3, 12-17.
- Pertuzatti, P. B., Barcia, M. T., Rebello, L. P. G., Gómez-Alonso, S., Duarte, R. M. T., Duarte, M. C. T., Godoy, H. T., & Hermosín-Gutiérrez, I. (2016). Antimicrobial activity and differentiation of anthocyanin profiles of rabbiteye and highbush

- blueberries using HPLC–DAD–ESI–MSn and multivariate analysis. *Journal of Functional Foods*, 26, 506–516.
- Rocha Concenço, F. I. G. Da., Stringheta, P. C., Ramos, A. M., Oliveira, T., & Hiroshi, I. (2014). Blueberry: Functional Traits and Obtention of Bioactive Compounds. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 2633-2645.
- Radošević, K., Ćurko, N., Srček, V. G., Bubalo, M. C., Tomašević, M., Ganić, K. K., & Redovniković, I. R. (2016). Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 45–51.
- Rodriguez-saona, L. E., & Wrolstad, R. E. (2001). Extraction, isolation, and purification of anthocyanins. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1.1.1–F1.1.1.
- Roobha, J.J., Saravanakumar, M., Aravindhan, K.M., & Devi, P.S. (2011). The effect of light, temperature, and pH on stability of anthocyanin pigments in *Musa acuminata* bract. *Research in Plant Biology*, 1, 5-12.
- Scheffé, H. (1963). The simplex-centroid design for experiments with mixtures. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 25, 235–263.
- Sharma, R. J., Gupta, R. C., Singh, S., Bansal, A. K., & Singh, I. P. (2016). Stability of anthocyanins- and anthocyanidins -enriched extracts, and formulations of fruit pulp of *Eugenia jambolana* ('jamun'). *Food Chemistry*, 190, 808–817.
- Zainal-Abidin, M.H., Hayyan, M., Hayyan, A., & Jayakumar, N.S. (2017). New horizons in the extraction of bioactive compounds using deep eutectic solvents: A review. *Analytica Chimica Acta*, 979, 1e23.



## Figure captions

**Figure 1:** Total anthocyanin extraction yields for different NADES vs. organic solvent (non-exhaustive extraction) (A) or for NADES 9 vs. acidified water and organic solvent (non-exhaustive and exhaustive extraction) (B). In panel A extractive conditions were 100 mg of blueberry powder and 5 mL of solvent. In panel B extractive conditions were 100 mg of blueberry and 24 mL solvent (exhaustive extraction), and 12 mL to solvent (non-exhaustive extraction), 1% citric acid and NADES 9. Data are presented as means ( $n=3$ )  $\pm$  SEM. Different letters indicate differences among different extractive conditions by the Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

**Figure 2.** Relationship between the oxygen radical absorbance capacity (ORAC), ferric reducing antioxidant power (FRAP) and total monomeric anthocyanin content of anthocyanin-rich fractions obtained using NADES 9, 1% citric acid and MetOH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (non-exhaustive extraction) solvents

**Table 1:** Simplex centroid design and observed response for the optimization of NADES composition\* for anthocyanin extraction

Run number	Independent variable						Response
	Choline chloride (X <sub>1</sub> )		Glycerol (X <sub>2</sub> )		Citric acid (X <sub>3</sub> )		Total anthocyanin content (mg equivalents of Cy-3-glu/100 g of blueberry powder)
	Coded value	Molar ratio	Coded value	Molar ratio	Coded value	Molar ratio	
1	1	3	0	0	0	0	249.39
3	0	0	0	0	1	3	275.22
5	0	0	1/2	1.5	½	1.5	158.98
7	1	1	1	1	1	1	261.10 ± 0,84
9	1/6	0.5	2/3	2	1/6	0.5	362.33 ± 1.10
2	0	0	1	3	0	0	37.77
4	½	1.5	1/2	1.5	0	0	202.13
6	0	0	1/2	1.5	½	1.5	186.96
8	2/3	2	1/6	0.5	1/6	0.5	230.23 ± 9.86
10	1/6	0.5	1/6	0.5	2/3	2	156.89 ± 13.06

\* All NADES were diluted with 25% water before use.

**Table 2:** Yield and price of mixtures of deep eutectic solvent compared to acidified water and organic solvent\*.

Abbreviation	Composition of solvent	Price of each solvent (US\$)**	Yield (mL)
NADES*-1	ChCl:gly:citric acid (3:0:0)	6.93	35
NADES-2	ChCl:gly:citric acid (0:3:0)	2.74	35
NADES-3	ChCl:gly:citric acid (0:0:3)	1.95	35
NADES-4	ChCl:gly:citric acid (1.5:1.5:0)	4.80	35
NADES-5	ChCl:gly:citric acid (0:1.5:1.5)	6.44	35
NADES-6	ChCl:gly:citric acid (1.5:0:1.5)	6.96	35
NADES-7	ChCl:gly:citric acid (3:3:3)	3.62	35
NADES-8	ChCl:gly:citric acid (2:0.5:0.5)	6.85	35
NADES-9	ChCl:gly:citric acid (0.5:2:0.5)	3.54	35
NADES-10	ChCl:gly:citric acid (0.5:0.5:2)	6.89	35
MetOH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Methanol:water:formic acid	8.23	35
1% citric acid	Water:citric acid (1%)	1.05	35

\*NADES green solvent prepared using choline chloride (ChCl), glycerol (gly) and citric acid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) at the molar ratio specified inside the parenthesis and then diluted with 25% water. Organic solvent prepared using methanol and formic acid (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA).

\*\*Costs of energy, equipment, and water were not considered for calculations.

**Table 3:** Characterization of anthocyanin profile in anthocyanin-rich fractions extracted from blueberry fruits using organic solvent, NADES, and water: 1% citric acid.

Peak	HPLC-DAD		MS/MS Fragments		Tentative identification		Relative percentage (mean $\pm$ standard deviation)		
							Extraction solvents		
	Rt(min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	MS	MS <sup>2</sup>	Aglycone	Anthocyanin	MetOH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	NADES 9	Water:1% citric acid
1	3.4 $\pm$ 0.2	523	465	303	Dp	Dp-3-gal	18.0 $\pm$ 1.0	17.9 $\pm$ 0.1	14.1 $\pm$ 0.1
2	5.3 $\pm$ 0.5	517	435	303	Dp	Dp-3-ara	10.6 $\pm$ 1.3	11.5 $\pm$ 1.5	9.1 $\pm$ 0.6
3	7.1 $\pm$ 0.5	525	479	317	Pt	Pt-3-glc	14.7 $\pm$ 0.5	11.8 $\pm$ 0.1	10.0 $\pm$ 0.1
4	8.2 $\pm$ 0.1	-	-	-	NI*	NI*	0.5 $\pm$ 0.1	0.7 $\pm$ 0.0	0.8 $\pm$ 0.0
5	11.1 $\pm$ 0.9	517	449	317	Pt	Pt-3-ara	5.3 $\pm$ 0.4	5.8 $\pm$ 0.2	4.7 $\pm$ 0.0
6	12.5 $\pm$ 0.6	522	493	331	Mv	Mv-3-gal	29.9 $\pm$ 0.5	26.6 $\pm$ 0.2	28.4 $\pm$ 0.2
7	12.9 $\pm$ 0.1	-	-	-	NI*	NI*	1.0 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.7	3.1 $\pm$ 0.5
8	14.3 $\pm$ 0.4	528	463	331	Mv	Mv3-ara	14.3 $\pm$ 0.0	18.2 $\pm$ 0.5	19.6 $\pm$ 0.1
9	15.5 $\pm$ 0.9	-	-	-	NI*	NI*	1.6 $\pm$ 0.0	1.7 $\pm$ 0.0	2.0 $\pm$ 0.0
10	17.4 $\pm$ 0.9	501	475	-	NI*	NI*	4.2 $\pm$ 0.0	4.2 $\pm$ 0.6	8.3 $\pm$ 0.2

Nomenclature abbreviations: Rt, retention time;  $\lambda_{\max}$ , wavelength of maximum absorption; Dp, delphinidin; Pt, petunidin; Mv, malvidin; gal, galactoside; ara, arabinoside; glc, glucoside; NI\*, not identified.

**Table 4:** Antioxidant activity of the anthocyanin-rich fraction extracted from blueberry fruits using different solvents.

<b>Solvent extractor*</b>	<b>FRAP (<math>\mu\text{mol TE/g DW}</math>)</b>	<b>ORAC (<math>\mu\text{mol TE/g DW}</math>)</b>
MetOH:H <sub>2</sub> O:CH <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	620.8 $\pm$ 20.2 <sup>ab</sup>	1793.2 $\pm$ 88.7 <sup>b</sup>
Water: citric acid 1%	572.0 $\pm$ 35.3 <sup>b</sup>	1800.9 $\pm$ 138.8 <sup>b</sup>
NADES 9	704.8 $\pm$ 8.5 <sup>a</sup>	2957.5 $\pm$ 47.3 <sup>a</sup>

\*All extracts were prepared at the same fruit:solvent ratio (0.1:12, w/v). Means that have no common superscript letter within the same column are different by the Tukey's test ( $p < 0.05$ ).

Figure 1:

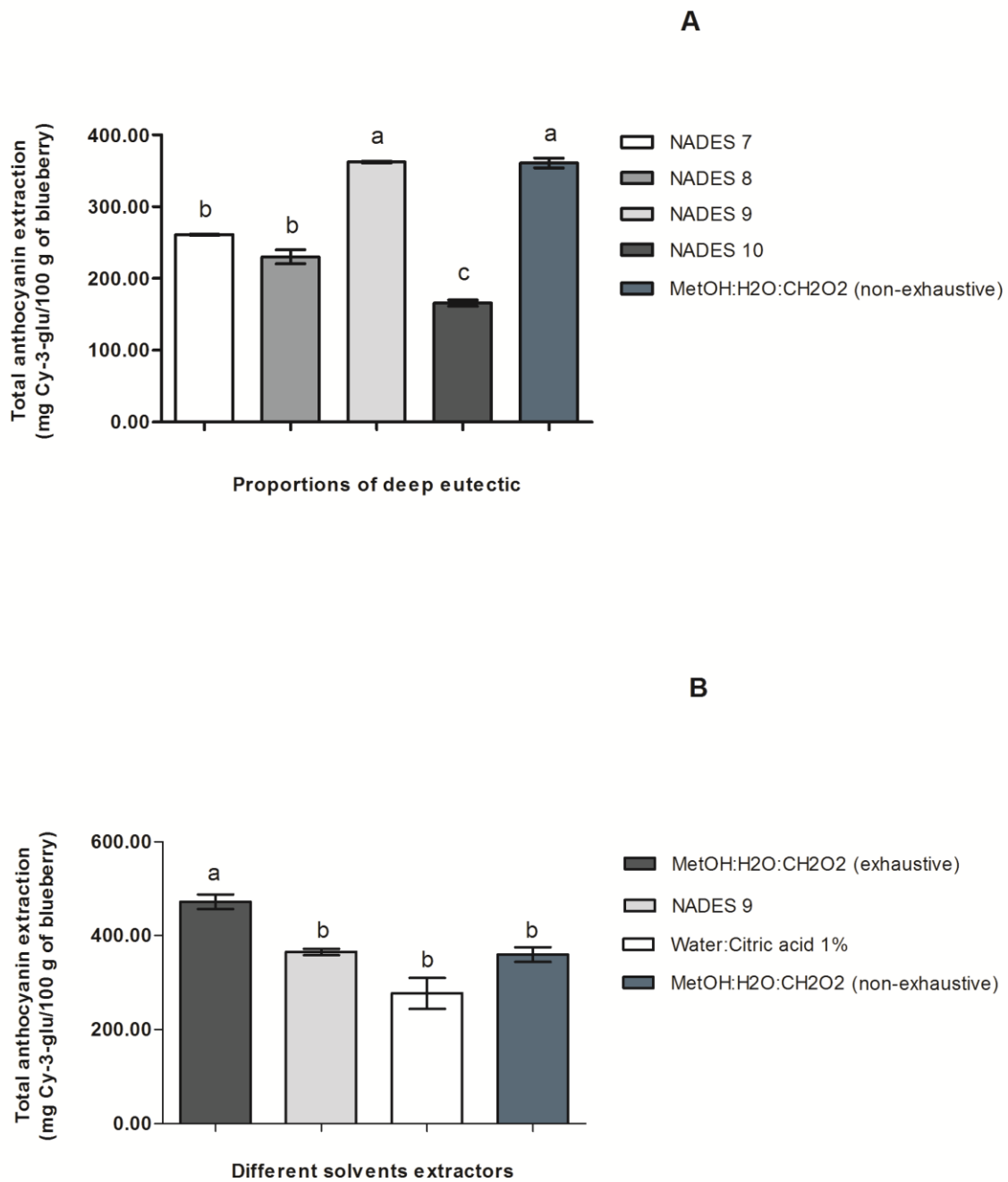
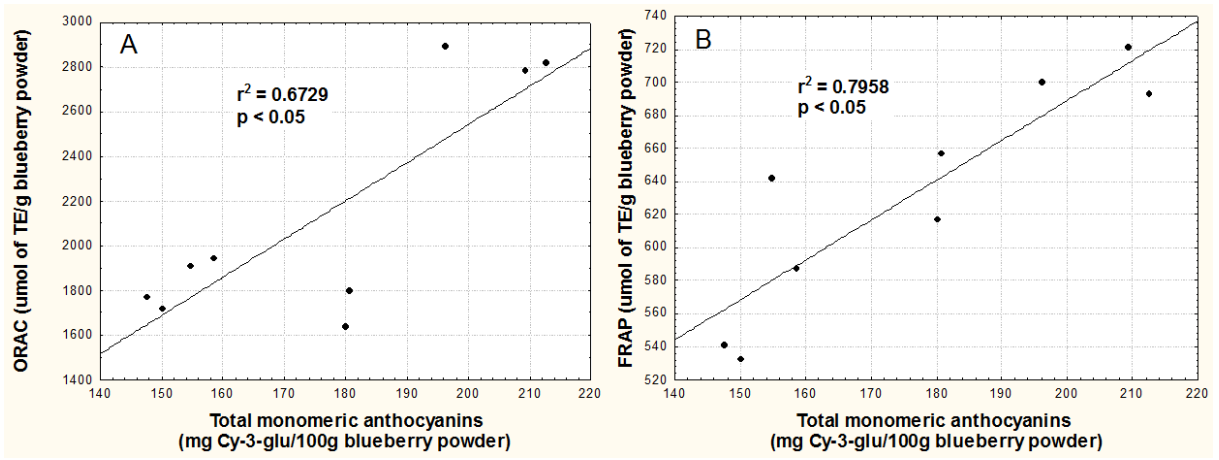


Figure 2:



## Supplementary data

### Deep natural eutectic solvents as a biocompatible tool for the extraction of blueberry anthocyanins

Dariane Trivisiol da Silva<sup>1</sup>, Roberson Pauletto<sup>3</sup>, Sabrina da Silva Cavalheiro<sup>2</sup>, Vivian Caetano Bochi<sup>4</sup>, Eliseu Rodrigues<sup>5</sup>, Cristiane de Bona da Silva<sup>6</sup>, Milene Teixeira Barcia<sup>3</sup>, Tatiana Emanuelli<sup>3\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Physiology and Pharmacology, Center for Health Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>2</sup>Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>3</sup>Department of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>4</sup>Department of Nutrition, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil;

<sup>5</sup>Natural Antioxidants Laboratory, Food Science and Technology Institute, Federal University of Rio Grande do Sul, 91501-970, Porto Alegre, RS, Brazil;

<sup>6</sup>Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Health Sciences of Porto Alegre, 90050-170, Porto Alegre, RS, Brazil;

\*Corresponding author Tel.: +55 55 3220 8547; +55 55 3220 8353. E-mail address:

[tatiana.emanuelli@ufsm.br](mailto:tatiana.emanuelli@ufsm.br) (Tatiana Emanuelli).



**Table S1:** Parameters of linear regression, LOD, LOQ and precision for anthocyanin quantification by HPLC analysis.

Method validation parameters	
Compound	Cyanidin-3- glucoside
Concentration range (mg/L)	8-20
Regression equation	$y = 0.000016875x - 3.8836$
R <sup>2</sup>	0.9820
LOD (mg/L)	0.020
LOQ (mg/L)	0.068
RSD for intraday repeatability (%)	0.44

LOD: limit of detection; LOQ: limit of quantification; RSD: relative standard deviation (%).

**Table S2:** ANOVA results of the regression models estimated from simplex centroid design for the optimization of NADES composition.

ANOVA Source	SS	DF	F-value	p-value	R <sup>2</sup>
Cyanidin-3- glucoside (mg/100 g of blueberry powder)					
Linear	114443.7	15	0.08	0.92	0.00
Quadratic	77753.7	12	1.88	0.18	0.48
Cubic	68249.9	11	1.53	0.24	0.88

**Table S3:** Physico-chemical characteristics of NADES 9 (ChCl:gly:citric acid at 0.5:2:0.5 molar ratio and diluted with 25% water).

	Description of solvent NADES
Density (g/cm <sup>3</sup> )	1.189 ± 0.003 g/cm <sup>-3</sup>
Viscosity (Pa·s)	24.81 ± 0.94 Pa·s
pH	1.17 ± 0.01

Data are presented as means ± SEM.

Fig S1:

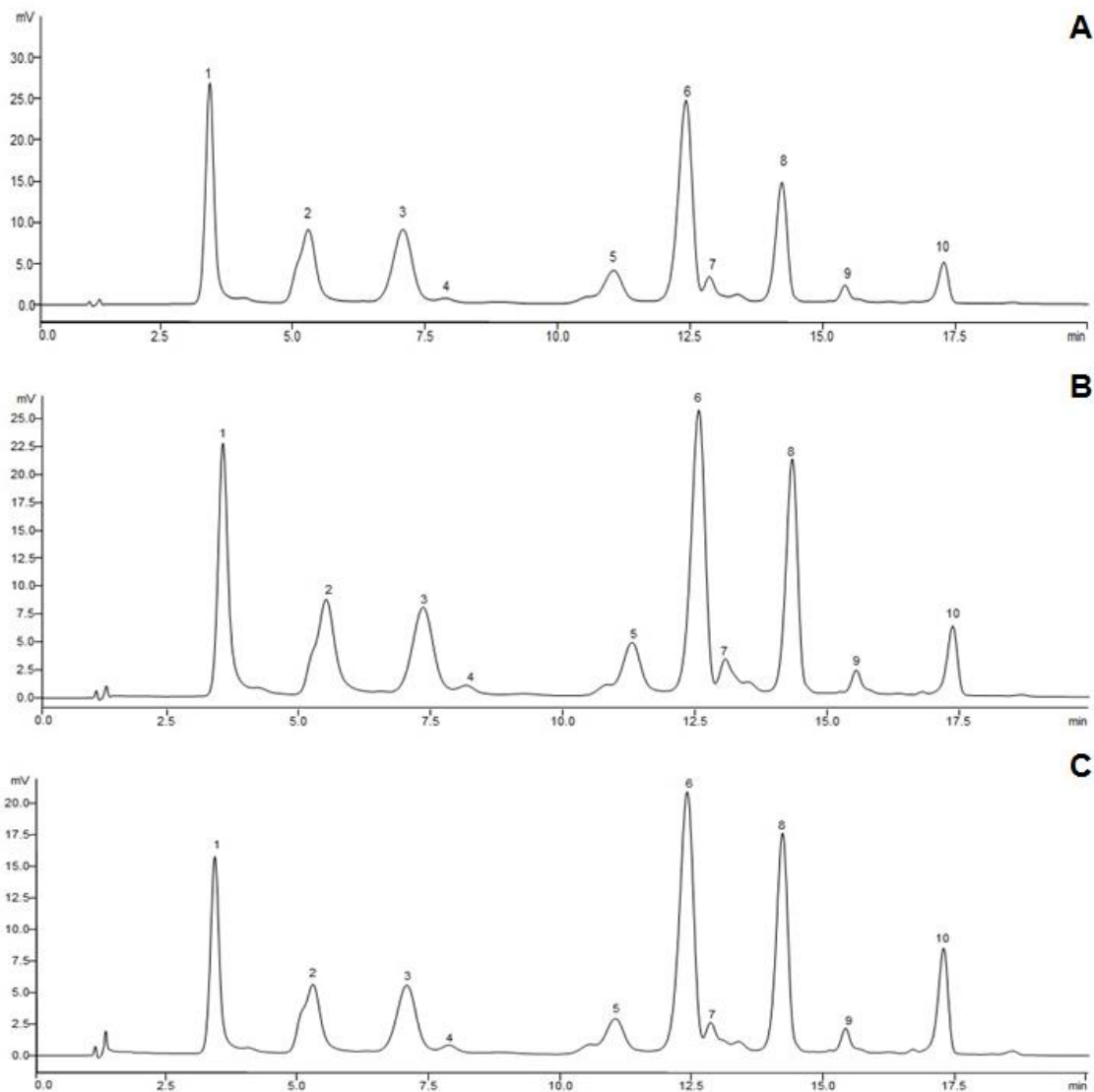


Figure S1: HPLC chromatograms of anthocyanin-rich fractions extracted from blueberry fruits using different solvents (non-exhaustive extraction): MetOH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A); NADES 9 (B); water:1% citric acid (C) at 520 nm: HPLC chromatograms of anthocyanin-rich fractions extracted from blueberry fruits using different solvents (non-exhaustive extraction): MetOH:H<sub>2</sub>O:CH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (A); NADES 9 (B); water:1% citric acid (C) at 520 nm. Identification of the peaks (A, B and C): delphinidin-3-galactoside (1); delphinidin-3-arabinoside (2); petunidin-3-glucoside (3); not identified (4); petunidin-3-arabinoside (5); malvidin-3-galactoside (6); not identified (7); malvidin-3-arabinoside (8); not identified (9 and 10).

## 2.2 MANUSCRITO 2

NATURAL DEEP EUTHETIC SOLVENT (NADES) YIELDS BIOCOMPATIBLE  
POLYPHENOL BLUEBERRY (*VACCINIUM CORYMBOSUM* L. X *VACCINIUM  
DARROWII* CAMP.) CV. O'NEAL EXTRACT THAT PROTECTS AGAINST ETHANOL-  
INDUCED GASTRIC ULCER IN RATS: REMARKABLE ROLE FOR THE  
ANTHOCYANIN FRACTION

Dariane Trivisiol da Silva, Renata Fritzsche Rodrigues, Natalia Minuzzi Machado,  
Luana Haselein Maurer, Lauren Fresinghelli Ferreira, Sabrina Somacal, Andréia Quatrin,  
Marcelo Leite da Veiga, Maria Izabel De Ugalde Marques Da Rocha, Marcia Vizzotto,  
Milene Teixeira Barcia, Tatiana Emanuelli

Manuscrito a ser submetido ao periódico:

*Journal Functional Foods*

**Natural deep euthetic solvent (NADES) yields biocompatible polyphenol blueberry (*Vaccinium corymbosum* L. x *Vaccinium darrowii* Camp.) cv. O'Neal extract that protects against ethanol-induced gastric ulcer in rats: remarkable role for the anthocyanin fraction**

Dariane Trivisiol da Silva<sup>1,2</sup>, Renata Fritzsche Rodrigues<sup>2</sup>, Natalia Minuzzi Machado<sup>2</sup>, Luana Haselein Maurer<sup>2</sup>, Lauren Fresinghelli Ferreira<sup>2</sup>, Sabrina Somacal<sup>2,4</sup>, Andréia Quatrin<sup>2</sup>, Marcelo Leite da Veiga<sup>3</sup>, Maria Izabel De Ugalde Marques Da Rocha<sup>3</sup>, Marcia Vizzotto<sup>5</sup>, Milene Teixeira Barcia<sup>4</sup>, Tatiana Emanuelli<sup>1,2,4</sup>.

<sup>1</sup>Graduate Program on Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>2</sup>Integrated Center for Laboratory Analysis Development (NIDAL), Department of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>3</sup>Department of Morphology, Center of Health Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil.

<sup>4</sup>Department of Food Technology and Science, Center of Rural Sciences, Federal University of Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brazil;

<sup>5</sup>Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Embrapa Clima Temperado, 96010-971, Pelotas, RS, Brazil.

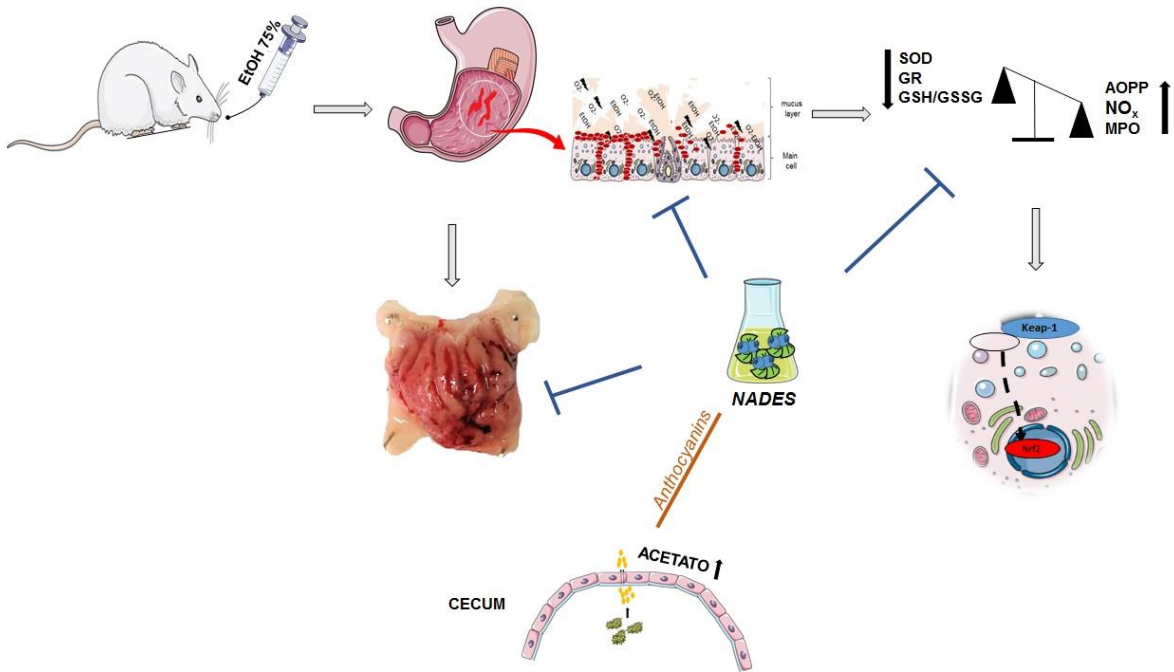
\*Corresponding author Tel.: +55 55 3220 8547; fax: +55 55 3220 8353. E-mail address: [tatiemanuelli@gmail.com](mailto:tatiemanuelli@gmail.com) (Tatiana Emanuelli).

## ABSTRACT

Blueberry is a polyphenol-rich fruit bearing great bioactive potential. The aim of this study was to use investigate the effects of a biocompatible blueberry (*Vaccinium corymbosum* L. x *Vaccinium darrowii* Camp.) cv. O'Neal crude extract (CE) obtained using natural deep eutectic solvent (NADES) and its fractions (anthocyanin-rich fraction – ARF; non-anthocyanin phenolic fraction - NAPF) in a model of ethanol-induced gastric ulcers in rats. Animals were treated for 14 days with water, NADES vehicle, CE, ARF, NAPF or lansoprazole (intra-gastric) and then received ethanol to induce gastric ulcer. CE decreased ulcer index and preserved the integrity of gastric mucosa. The pretreatment with CE or ARF reduced glutathione depletion and the inflammatory response. All treatments, including NADES vehicle reduced protein oxidation and NO overproduction in ethanol-treated rats. Additionally, ARF increased short-chain fatty acids in feces. These findings suggest that NADES can be used to obtain biocompatible extracts of blueberry that exhibit gastroprotective effects with no need of solvent removal.

**Keywords:** Gastric ulcer, Oxidative stress, Antioxidants defenses, Polyphenols, Green solvent.

### Graphical abstract





## 1. Introduction

Gastric ulcer is a common gastrointestinal disorder that affects around 10% of population worldwide (Lauret, Rodriguez-Peláez, Pérez, & Rodrigo, 2015). The increasing incidence of gastric ulcer is associated with *Helicobacter pylori* infections, alcohol abuse, stress, smoking, nutritional deficiencies and frequent ingestion of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) (Schubert & Peura, 2008). Gastric ulcer is characterized by an imbalance between protective (mucus, prostaglandins, bicarbonate and nitric oxide) and aggressive (pepsin and hydrochloric acid) agents in the gastric mucosa (Shaker, Mahmoud, & Mnaa, 2010).

Ethanol (EtOH) can be used to induce experimental gastritis and gastric ulceration (Franke, Teyssen, & Singer, 2006). EtOH stimulates the instability of gastric mucosa by increasing the mucosal permeability and release of vasoactive products, leading to vascular damage and necrosis (Adinortey, Ansah, Galyuon, & Nyarko, 2013). The overproduction of reactive oxygen species (ROS), depletion of non-protein sulfhydryl compounds (NPSH) as glutathione (GSH), lipid peroxidation, as well as, impairment in the antioxidant defense system also contribute to the EtOH-induced gastric damage (Cadirci et al., 2007; Mota et al., 2011).

The synthetic drugs are used in the clinical treatment of gastric ulcers pose serious complications after prolonged use (Freedberg, Kim, & Yang, 2017). Therefore, the discovery of natural compounds or nutritional strategies that can attenuate or prevent gastric ulcers are particularly relevant. Anthocyanins and other phenolic compounds have been shown to exhibit beneficial effects against gastric ulcer, by decreasing lipid peroxidation, increasing GSH levels and antioxidant enzymes, besides attenuating the inflammatory response (Li, Xu, Zhao, Chang, & Rhee, 2008; Kim, Park, Paik, & Chang, 2011).

The mechanisms responsible for the antioxidant action of polyphenols are complex and generally attributed to their ability to directly eliminate free radicals and more recently to the upregulation of endogenous antioxidant defenses (Bryan, Olayanju, Goldring, & Park, 2013). One of the recently studied alternatives is modulation of the nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) (S. J. Kim, Kim, Shim, & Chang, 2014). Nrf2 plays a central role in the homeostatic control of the redox gene regulatory network. The nuclear translocation of this factor is the main route involved in cell protection against oxidative stress, because it upregulates the expression of antioxidant genes (Jung et al., 2010).

Plant polyphenols have been demonstrated potential health benefits (Mojzer, Hrcic, Skerget, Knez, & Bren, 2016). However, the extraction of these compounds is performed with organic solvents, which yields highly toxic wastes (Kalia, Sharma, Singh, & Singh, 2008). Recently, a new green extraction technology, known as the natural deep eutectic solvent (NADES), has emerged. NADES are based on mixtures of natural, sustainable, and low toxicity components: non-toxic quaternary ammonium salts (e.g. choline chloride) and uncharged hydrogen-bond donors (e.g. amines, sugars, alcohols and carboxylic acids) (Cvjetko Bubalo, Vidović, Radojčić Redovniković, & Jokić, 2015). Recent studies on phenolic grape skin extracts obtained using NADES showed high antioxidant capacity and low cytotoxicity (Radošević et al., 2016; Cvjetko Bubalo, Ćurko, Tomašević, Kovačević Ganić, & Radojčić Redovniković, 2016), which makes NADES good solvents to be used for nutritional purposes.

Blueberry (*Vaccinium corymbosums*) is a North American native fruit rich in phenolic compounds such as anthocyanins and flavonoids (Norberto, Silva, Meireles, Faria, & Pintado, 2013). Studies on the crude extracts of blueberry species as

*Vaccinium leschenaultii* and *Myrtus communis* L., which were obtained using solvents as acetone, methanol and water, have demonstrated potential health benefits, including protection against gastric ulcers (Nagulsamy, Ponnusamy, & Thangaraj, 2015; Jabri, Rtibi, Tounsi, Hosni, Saklya, & Sebaia, 2016). However, the involvement of the Nrf2 pathway in protective effect of blueberry extracts against gastric ulcers has not yet been investigated. In addition, the use of NADES in the extraction of blueberry polyphenols has not been explored, which can result in extracts with greater biocompatibility and differentiated biological activity.

This study was aimed to evaluate the gastroprotective effect of blueberry (*Vaccinium corymbosums*) extracts obtained using natural deep eutectic solvent (NADES) in a model of EtOH-induced gastric ulcer in rats. Additionally, the bioactive fraction was investigated by comparing the protective effects of the crude extract to the effects of the anthocyanin fraction and the non-anthocyanin phenolic fraction. We have also provided evidence on the mechanisms involved in the gastroprotective effects.

## **2. Materials and methods**

### **2.1. Samples**

Blueberry fruits (*Vaccinium corymbosums*) of the O'Neal cultivar were collected in an orchard belonging to the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa Clima Temperado, Pelotas, Rio Grande do Sul) in November, 2016. The fruits were frozen and lyophilized in a Terroni® model LS3000 (São Carlos, São Paulo, Brazil). Lyophilized frozen samples were ground in a mill (Marconi, São Paulo, Brazil) in liquid nitrogen and stored at -20°C in aluminum bags until the end the

experiments. This blueberry lyophilized powder had 11% moisture, 2.8% protein, 0.9% ash, 3.9% fat, 36.7% dietary fiber and 44.7% soluble sugars.

## **2.2 Preparation of NADES solvent and blueberries extract and fractions**

NADES solvent was prepared by the mixture of choline chloride, glycerol, and citric acid at a molar ratio of 0.5:2:0.5, and was stirred in a flask at 80°C for 30 min until forming a homogeneous liquid (Cvjetko Bubalo, Vidović, Radojčić Redovniković, & Jokić, 2015). Thereafter, NADES solution was diluted with 25% water (v/v).

For obtaining the crude extract (CE), powder samples of blueberries (1.2 kg) were extracted with 3 L NADES solvent, as previously described by Cvjetko Bubalo et al. (2016) with the following modification. Extracts were submitted to an ultrasonic bath (40 kHz, 50 min, room temperature) and then centrifuged at 2100 x g for 15 min. The supernatant was collected, and adjusted with NADES to a final volume of 3 L and lyophilized. The viscous solution obtained was diluted with distilled water (1:1, v/v) and had its composition analyzed by HPLC coupled to a photodiode array detector. In the blueberry CE, a total of 4.57 mg of total polyphenols/mL of blueberry extract were quantified. The anthocyanin-rich fraction had 1.15 mg of cyanidin-3-glucoside (cy-3-glu) equivalents/mL of extract, whereas the non-anthocyanin polyphenols fraction had 1.11 mg of catechin equivalents (hydroxybenzoate derivatives)/mL and 2.30 mg of quercetin equivalents (flavonoid derivatives)/mL of extract. Anthocyanins and non-anthocyanin phenolics were identified based on the retention time, maximum wavelength and MS fragments. Six compounds were identified in the anthocyanin fraction of the blueberry extract (% of total anthocyanins): delphinidin-3-galactoside (24.85%), delphinidin-3-arabinoside (15.82%), petunidin-3-glucoside (12.30%), petunidin-3-arabinoside (5.04%),

malvidin-3-galactoside (20.82%) and malvidin-3-arabinoside (9.72%). The non-anthocyanin polyphenol fraction of blueberry extracts contained (% of total non-anthocyanin polyphenols): quercetin-hexoside (44.40%), catechin (8.62%) and myricetin-hexoside (8.27%).

To obtain ARF and NAPF, the CE was subjected a solid phase extraction (SPE) of according Rodriguez-Saona & Wrolstad, (2001) modified by Bochi, Godoy, & Giusti, (2015). The purified extracts were obtained with C-18 columns (max 10 g packed bed, 60 mL, Giga Tubes, Strata C18-E from Phenomenex, Torrance, USA). The SPE material was activated with 60 mL methanol and conditioned with three times of 60 mL acidified water (0.35%, v/v, formic acid). Samples were initially eluted with formic acid aqueous solution (0.35%, v/v) to remove polar interfering compounds. Then, samples were eluted with two volumes of ethyl acetate to release the less polar phenolic compounds (NAPF) and thereafter with methanol acidified with 0.1% (v/v) formic acid to release anthocyanins (ARF). Solvents were evaporated using a rotary evaporator (Büchi-R3™, Flawil, Switzerland) at  $38 \pm 2^\circ\text{C}$  and samples were adjusted to a known volume (2.5 mL) using acidified water (0.35%, v/v, citric acid).

## **2.5. Animals and induction of gastric lesions by EtOH**

Fifty-six adult male Wistar rats (150-200 g) were provided by the Central Animal House of the Federal University of Santa Maria (UFSM, RS). All procedures adopted were approved by the Committee for Care and Use of Experimental Animal Resources/UFSM (protocol number 3935111116/2017). Animals were housed in standard polypropylene cages (four rats/cage) and kept under controlled temperature ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $55 \pm 5\%$ ) at a 12/12 h light/dark cycle with access to food

and water *ad libitum*. Animals were divided into seven experimental groups (n = 8/group) as follows (Figure 1):

(I) Control group (Control): received distilled water by gavage for 14 days and was not submitted to gastric ulcer induction.

(II) Water-ethanol group (Water-EtOH): received distilled water by gavage for 14 days before induction of gastric ulcer.

(III) Vehicle-ethanol group (Vehicle- EtOH): received vehicle (NADES extraction solution) by gavage for 14 days before induction of gastric ulcer.

(IV) Crude extract of blueberry-ethanol group (CE- EtOH): received 10.0 mg/kg b.w. of CE by gavage for 14 days before induction of gastric ulcer.

(V) Anthocyanin-rich fraction-ethanol group (ARF- EtOH): received 4.2 mg/kg b.w. of blueberry fraction rich in anthocyanins by gavage for 14 days before induction of gastric ulcer.

(VI) Non-anthocyanin phenolic fraction-ethanol group (NAPF- EtOH): received 5.8 mg/kg b.w. of blueberry fraction rich in non-anthocyanin phenolics by gavage for 14 days before induction of gastric ulcer.

(VII) Lansoprazole-ethanol group (LAN- EtOH): received 30 mg/kg b.w. of lansoprazole per gavage for 14 days before induction of gastric ulcer.

The doses of blueberry extracts were expressed as mg of total polyphenol compounds quantified by HPLC. The dose of 10 mg/kg was chosen on a pilot study, where the crude extract was administered at 5, 10 and 15 mg of total polyphenols/kg body weight for 14 days and the best gastroprotective effects were observed at 10 mg/kg. LAN was used as a positive control as it is a standard drug used for the clinical treatment of gastric ulcers.

After 14 days of treatment, rats were fasted for 12 h after the last gavage procedure to ensure an empty stomach and efficient induction of gastric lesions. Gastric lesions were induced by an oral administration of 75% EtOH (2 mL/kg b.w.) (Robert, 1979). One hour after EtOH administration, animals were anesthetized with isoflurane and euthanized by cardiac puncture. The stomach of each rat was quickly removed and opened along the great curvature. The glandular gastric tissue was visually inspected for macroscopical analysis of gastric injury (expressed as ulcer index). Then, each stomach was dichotomized, one moiety was immersed in 10% formalin solution for histopathological analyses, whereas the other moiety was divided into 3 parts and stored at -80°C for biochemical analyses.

## 2.6. The gastric lesion index

After opening, the stomachs were fixed to assess the index of the gastric lesion. Flattened stomach samples were photographed and the ulcer area (mm<sup>2</sup>) was measured using NIH Image J 1.36b imaging software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). The index ulcer was calculated as described by Ganguly (1969) using the formula:

$$\text{Ulcer index (UI)} = 10/X$$

Where  $X = \text{Total mucosal area} / \text{Total ulcerated area}$ .

Inhibition percentage was calculated according to the formula below:

$$[(\text{UI}_{\text{Water group}} - \text{UI}_{\text{Pretreated group}}) / \text{UI}_{\text{Water group}}] \times 100\%$$

## 2.7. Histological analysis

Samples of stomach tissue fixed in 10% buffered formalin solution were processed and paraffin embedded. Thereafter, 6 mm thick histological sections were

cut and stained with hematoxylin-eosin (HE). Two slides of each sample were prepared and each microscopic slide was evaluated in 10 histological fields by two independent operators in a double-blind method to detect alterations. Samples were evaluated for the integrity of the gastric mucosa, hyperemia as well as neutrophil infiltration.

## **2.8. Biochemical analysis**

Following the macroscopic analyses, stomach samples (0.2 g each), were homogenized in 0.6 mL of 0.01 M phosphate buffered saline with 0.136 M NaCl (pH 7.4), on ice using an ultra-Turrax homogenizer and centrifuged at 4°C (5000 x *g*, 10 min). The supernatants were collected and used for biochemical assays.

### **2.8.1. Markers of oxidative stress**

Advanced oxidation protein products (AOPP) were determined at 340 nm after solubilization of lipids with citric acid (Hanasand et al., 2012). The levels of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were measured by the fluorimetric method as previously described by Hissin & Hilf, 1976. Nitrite and nitrate levels (NO<sub>x</sub>) were assessed using vanadium (III) combined with detection by Griess reaction, according to Miranda, Espey, & Wink, 2001. Nitrite/nitrate was used as an estimate of NO level as it is produced during the oxidative metabolism of NO (Radi, 2004).

### **2.8.2. Inflammatory parameter**

Myeloperoxidase (MPO) activity was determined in stomach supernatant as previously described Grisham, Hernandez, & Granger, (1986). Samples of stomach



supernatant were mixed with potassium phosphate buffer (50 mM, pH 6.0) and hexadecyltrimethylammonium bromide (0.5%). The kinetic analysis of MPO was started by adding hydrogen peroxide (0.005%) and assessed at 450 nm at 25°C.

### **2.8.3. Antioxidant defense system**

Superoxide dismutase (Cu/Zn SOD) activity was determined by inhibition of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction at 560 nm (Spitz & Oberley, 1989). Glutathione reductase (GR) activity was determined using oxidized glutathione and NADPH at 340 nm (Carlberg & Manner, 1979). Glutathione-S-transferase (GST) activity was measured at 340 nm, using 1-chloro-2,4 – dinitrobenzene (CDNB) as the substrate (Habig, Pabst, & Jakoby, 1974). Glutathione peroxidase (GPx) activity was determined using reduced glutathione, GR and NADPH. The method is based on the oxidation of NADPH, which is indicated by a decrease in absorbance at 340 nm (Paglia, D. E., & Valentine, 1967).

### **2.9. Nrf2 protein expression**

Gastric tissue was homogenized in cold buffer A (pH 7.9), consisting of 50 mM hydroxyethyl piperazineethanesulfonic acid (HEPES), 1 M potassium chloride (KCl), 1 M magnesium chloride (MgCl<sub>2</sub>), 100 mM ethylenediamine tetraacetic acid (EDTA), 200 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 100 µL Triton X-100, 100 mM sodium orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), 1 M dithiothreitol (DTT) and left on ice for 15 min. Then, tissue lysates were centrifuged at 15,000 x g at 4°C for 30 min and supernatants was collected (cytoplasmic fraction). The pellets were homogenized in cold buffer B (pH 7.9) containing 50 mM HEPES, 1 M KCl, 1 M MgCl<sub>2</sub>, 5 M sodium chloride (NaCl), 100 mM EDTA, 200 mM PMSF, 2,5% glycerol, 100 µL Triton X-100,

100 mM  $\text{Na}_3\text{VO}_4$ , 1 M DTT. Then, samples were sonicated, centrifuged at  $15,000 \times g$  at  $4^\circ\text{C}$  for 30 min and the supernatant was collected (nuclear fraction). The protein content was determined according to Lowry (1951). Protein lysates (50  $\mu\text{g}$ ) were resolved on a 12.5% SDS-PAGE (cytosolic Nrf2 and  $\beta$ -actin) or 7.5% SDS-PAGE (nuclear Nrf2 and lamin-B1) and transferred to nitrocellulose membranes. After membrane blocking (5% low-fat dried milk in TBS for 1 h) membranes were incubated overnight at  $4^\circ\text{C}$  with primary antibodies for Nrf2 (1:1000; ab31163, Abcam, Cambridge, MA, USA), for lamin-B1 (1:4000; 33-2000, ThermoFisher Scientific, MA, USA) and  $\beta$ -actin (1:10000; ACTN05 (C4), ThermoFisher Scientific, MA, USA). Membranes were thereafter probed with HRP-conjugated secondary antibodies and revealed using the ECL system (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Membranes were scanned using ChemiDoc MP (Bio-Rad, Hercules, CA, USA). Band intensity was quantified with Quantity One software (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) and normalized to  $\beta$ -actin (cytoplasmic fraction) or lamin-B1 (nuclear fraction) content.

## **2.10 Short-chain fatty acids (SCFA) in cecal feces**

The SCFAs of fecal samples were extracted as described by Zhao, Nyman, & Jönsson (2006) with some modifications. About 0.5 g of frozen cecal feces were homogenized with 2 mL of ultrapure water, the pH was adjusted to 2-3 using an aqueous solution of 2 N HCl. Samples were centrifuged at  $1700 \times g$  for 20 min and the supernatant was collected. The internal standard, 2-ethyl-butyric acid (54.75 mM in 12% formic acid), was added to reach a final concentration of 1 mM. Samples were injected in an Agilent Technologies gas chromatograph (HP 6890 N) equipped with a capillary column Nukol TM (30 m x 0.25 mm; 0.25  $\mu\text{m}$ ) and flame ionization

detector (FID). Chromatographic conditions were: temperature of injection port was maintained at 200°C; carrier gas was nitrogen (1 mL/min); injected volume 1 µL with split ratio (10:1). The oven temperature was programmed as follows: kept at 100°C for 0.5 min, then it was increased to 180°C at 8°C/min and maintained at this temperature for 1 min and then the temperature was increased to 200°C at 20°C/min and maintained at 200°C for 10 min<sup>40</sup>. A standard mix of volatile free fatty acids (46975-U, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) were diluted in formic acid solution (12%) and used as external standard.

### **2.11. Statistical analysis**

Statistical analyses were performed using one-way ANOVA followed by Duncan's *post hoc* test when appropriate. Data that did not meet the ANOVA assumptions were analyzed by Kruskal Wallis analysis, followed by multiple comparison tests. Results were expressed as the mean ± SEM and differences were considered statistically significant when  $p \leq 0.05$ . Data were analyzed using the Statistica® V.7 software system (Statsoft Inc., 2004).

## **3. Results**

### **3.1. Effect of blueberry extracts on EtOH-induced gastric damage**

Intragastric administration of EtOH induced macroscopic morphological changes, as shown in Figure 2. The water-EtOH group presented severe mucosal injury characterized by hemorrhagic ulceration when compared to the control group (Figure 2B;  $p \leq 0.05$ ). These changes were significantly prevented by pretreatment with CE, while the pretreatment with ARF, NAPF or LAN partially prevented the formation of gastric ulcers (Figure 2B;  $p \leq 0.05$ ). Pretreatment with the vehicle used to

obtain the CE extract was not able to attenuate EtOH-induced damage (Figure 2B;  $p \leq 0.05$ ).

In addition to macroscopic damage, EtOH also caused histological gastric damage evidenced by disseminated hemorrhage, inflammatory neutrophil infiltration and loss of glandular structure (water-EtOH group, Figure 3B). Similar histological damages were observed in the vehicle-EtOH group (data not shown). Pretreatment with CE yielded protected against EtOH-induced ulcer with smaller ulcerative changes in the mucosal surface, rare hemorrhagic areas and preservation of glandular structure (Figure 3C). The ARF and NAPF groups (Figure 3D and E) yielded partial protection against EtOH-induced ulcer, being characterized by superficial hemorrhagic infiltration, light dilation and loss of glandular structure, which was more severe in the NAPF group. The gastric mucosa of animals that received LAN showed little preservation of the histological aspects and were only slightly more preserved than the water-EtOH group (Figure 3F).

### 3.2. Effect of blueberry extracts on EtOH-induced changes in gastric oxidative status and antioxidant enzymes

Intragastric administration of EtOH (water-EtOH) caused oxidative stress characterized by increased AOPP and  $\text{NO}_x$  levels along with decreased GSH/GSSG ratio in comparison to the control group (Figure 4;  $p \leq 0.05$ ). The pretreatment with NADES vehicle, CE and NAPFs completely prevented the AOPP changes, whereas ARF and LAN partially prevented this effect (Figure 4A;  $p \leq 0.05$ ). Additionally, all pretreatment with all blueberry extracts, NADES vehicle or LAN were able to completely prevent the increase in  $\text{NO}_x$  levels (Figure 4B;  $p \leq 0.05$ ). The decrease in GSH/GSSG ratio was completely prevented in the CE, ARF and LAN groups but

partially prevented in the vehicle group (Figure 4C;  $p \leq 0.05$ ). The pretreatment with NAPF had no protective effect on the GSH-GSSG ratio (Figure 4C;  $p \leq 0.05$ ).

Compared to the control group, GPx and GST activities were increased, whereas SOD and GR activities were decreased in the water-EtOH group (Figure 5A-D;  $p \leq 0.05$ ). The pretreatment with ARF partially restored SOD and GR activities, whereas LAN caused an additional decrease in GR activity and the other treatments did not prevent changes in SOD or GR activities (Figure 5A and B;  $p \leq 0.05$ ). The pretreatments with CE or vehicle prevented the increase in GPx activity caused by EtOH, whereas the pretreatment with ARF, NAPF or LAN caused a remarkable decrease in the activity of this enzyme compared to the control group (Figure 5C;  $p \leq 0.05$ ). The pretreatment with NADES vehicle or NAPF completely prevented the increase in GST activity triggered by EtOH, whereas ARF caused a partial decrease (Figure 5D;  $p \leq 0.05$ ). CE and LAN did not prevent EtOH-induced changes in GST activity (Figure 5D;  $p \leq 0.05$ ).

EtOH administration or pretreatment with blueberry extracts, LAN or NADES vehicle caused no significant changes in the nuclear levels of Nrf2 factor, which is a key transcription factor that regulates the expression of antioxidant/phase II detoxifying enzymes (Fig. 6B;  $p > 0.05$ ).

### 3.3. Effect of blueberry extracts on EtOH-induced gastric inflammation

MPO activity, which is a marker for neutrophil infiltration, was increased after EtOH administration (water-EtOH and vehicle-EtOH groups) when compared to the control group (Figure 7;  $p \leq 0.05$ ). Pretreatment with CE, ARF or LAN showed anti-inflammatory action by preventing the increase in MPO activity (Figure 7;  $p \leq 0.05$ ), whereas NAPF had a partial preventive effect.

### 3.4. Effect of blueberry extracts on the feces content of short chain fatty acids (SCFA) after EtOH administration

SCFA are metabolites of anaerobic bacteria in the large bowel. SCFA can modulate the immune response and inflammation and have been shown to play a protective role in gastrointestinal disorders as gastric ulcers (Besten et al., 2013). The fecal concentrations of SCFA (acetatic, propionic, and butyric acids) were unaffected by administration of ethanol when compared to the control group. The pretreatment with ARF significantly increased the fecal content of acetatic acid (Figure 8A;  $p \leq 0.05$ ), whereas NADES vehicle decreased propionic and butyric acid concentrations (Figure 8B and C;  $p \leq 0.05$ ). In addition, the pretreatment with CE decreased the fecal content of butyric acid compared to the control group.

## 4. Discussion

In the present study, we investigated the gastroprotective effects of a biocompatible NADES blueberry extract in the model of gastric ulcers induced by EtOH in rats. NADES is a new green extraction technology for obtaining extracts rich in bioactive compounds (Cvjetko Bubalo et al., 2015), which has been recently considered the solvents of the future, due to their eco-friendly and non-toxic properties, which are extremely useful for the preparation of nutraceuticals and food extracts (Faggian et al., 2016).

Linear hemorrhages and ulceration craters were observed in the gastric mucosa of rats after EtOH administration, which is in accordance with previous reports on this model (W. F. Li et al., 2014). EtOH increases vascular permeability and exposes gastric mucosa to the proteolytic and hydrolytic actions of pepsin and HCl, besides it causes blood flow stasis and microvascular disruption (Adinortey et

al., 2013). In the present study, the pretreatment with NADES blueberry CE showed a notable protection against macroscopical and histopathological gastric lesions induced by EtOH administration, which were clearly observed in the water- and vehicle-EtOH groups. Both the anthocyanin and non-anthocyanin polyphenols of blueberry extract appear to have contributed to the protective effect as rats pretreated with the isolated ARF and NAPF (at equivalent amounts to those found in the CE) had a partial protective effect. Blueberry polyphenols appear to have high stability in the stomach as > 90% of polyphenols were recovered during an *in vitro* gastric digestion assay (Correa-Betanzo et al., 2014). It is noteworthy that the anthocyanin and non-anthocyanin fractions of blueberry NADES extract were as effective as LAN to prevent EtOH-induced damage, whereas the crude extract had greater effect than LAN. LAN is a proton pump inhibitor that has been widely used in the treatment and prevention of gastrointestinal disorders as gastric ulcers (Stedman & Barclay, 2000) and was used as a positive control in this study. Based on these results, we can suggest that NADES blueberry CE have promising gastroprotective properties. Bilberry extracts (*Vaccinium leschenaultii* - European blueberries) obtained using acetone and methanol solvents have been previously demonstrated to protect against EtOH-induced gastric ulcers in rats (Nagulsamy et al., 2015). However, blueberry NADES extract have a great advantage over this previously studied extract as NADES are biocompatible and therefore does not require solvent removal before use. This is the first study on the bioactive effect of blueberry NADES extracts and one of the few studies investigating the biological effects of flavonoid NADES extracts in animal models (Faggian et al., 2016).

In addition to mucosal damage, alcohol administration promotes ROS overproduction, which plays a crucial role in the pathogenesis of gastric ulcer (Y. Liu

et al., 2017). EtOH administration increased protein oxidation (AOPP) and NO levels in this study. We also observed GSH depletion in mucosal gastric tissue of water-EtOH group. GSH is a tripeptide that acts in the primary antioxidant defense system and the decrease of GSH/GSSG ratio has been used as a marker of oxidative stress (Zitka et al., 2012). The concomitant increase of GPx and GST activities in the water-EtOH group likely collaborated to decrease the levels of GSH, which is a co-factor for these enzymes (Birben et al., 2012). Moreover, the activity of GR, which is responsible for recycling oxidized glutathione, was decreased by more than 50% in the water- and vehicle-EtOH groups. These results show that EtOH administration promotes oxidative stress along with relevant changes in enzymatic and non-enzymatic antioxidant defense systems, collaborating to the damage of gastric mucosa.

The gastroprotective effects of blueberry CE and its fractions (ARFs and NAPFs) were associated to a decrease in the oxidative stress in gastric mucosa, namely, decreased AOPP and NO levels and increased GSH/GSSG ratio. This effect can be related to the direct free radical scavenging capacity of flavonoid polyphenols, which has been mainly attributed to the presence of catechol groups in ring B, double bonds and hydroxyl substitutions in the aromatic ring (H. Wang et al., 2017; Ogawa et al., 2011). The protective effect against the EtOH-induced increase in protein oxidation and NO levels was associated to the anthocyanin and non-anthocyanin fractions of blueberry extract. In addition, the NADES vehicle (vehicle-EtOH group) also appears to contribute to the protective effect of crude blueberry extracts against increased protein oxidation and NO levels. This result reveals that NADES are not only biocompatible but may also have interesting protective properties *per se*.



Additionally, we highlight the protective effect of the anthocyanin fraction of blueberry extract, which was as effective as LAN to prevent GSH depletion and appears to be responsible for the protective effect of CE against GSH depletion. Moreover, ARF was the sole treatment effective to prevent the decrease of SOD and GR activities induced by EtOH, yet the prevention was partial. Similarly, anthocyanins from *Rubus coreanus* exhibited antiulcer activity in a rat model of acute ulcer by preventing changes in the activities of SOD and GPx (S. J. Kim et al., 2011). We observed that blueberry ARF extracted using NADES solvent had greater potency to remove oxygen radicals (ORAC assay) than ARF obtained using conventional organic solvents (unpublished data) and this may be due to the fact that NADES may improve solubility and bioavailability of flavonoids (Faggian et al., 2016). Blueberry ARF is mainly composed by delphinidin and malvidin derivatives, followed by petunidin derivatives. Although there are no studies on these compounds in models of gastric ulcer, the anthocyanin cy-3-glu has demonstrated gastroprotective properties (C. Y. Li, Xu, Zhao, Chang, & Rhee, 2008). Our findings suggest that NADES blueberry extract rich in polyphenols, acted by directly removing the excess of free radicals induced by EtOH administration but only the anthocyanin fraction of NADES extract of blueberry prevented the depletion of gastric GSH reserves. These mechanisms may have contributed to the gastroprotective effect of CE and may offer a nutritional strategy for the prevention of gastric lesions.

GSTs are phase II detoxifying enzymes that remove ROS and xenobiotics by catalyzing their conjugation to GSH (Habig, Pabst & Jakoby, 1974) . As expected, EtOH administration increased GST activity and contributed to decrease GSH/GSSG ratio. Pretreatment with LAN also increased GST activity since this enzyme is involved in the metabolism of LAN (Agnihotri, Kaur, Kaur, & Sarotra, 2007).

Pretreatment with blueberry fractions (ARFs and NAPFs) or NADES vehicle prevented EtOH-induced changes in GST, but surprisingly the pretreatment with CE did not prevent the increase in GST activity. This finding suggests an interaction between polyphenols and NADES that abolished the decrease in GST activity. Thus, the recovery of GSH/GSSG ratio promoted by CE appears to be related to a direct radical scavenging activity thereby sparing GSH content rather than by modulating recycling (GR) or consumption (GST).

To further elucidate the mechanisms involved in the gastroprotective action of blueberry NADES extract, we investigated the behavior of MPO, which is a marker of neutrophil infiltration and inflammatory response in gastric ulcers (Nishida, Ohta, & Ishiguro, 1998). The activation and infiltration of neutrophils is involved in the start of lesion formation in the stomach. Accordingly, gastric mucosal lesions induced by EtOH were characterized by neutrophil infiltration (Fig. 2) and were accompanied by the acute rise of MPO activity (Fig. 7). Similarly, a previous study reported that the reduction of neutrophil infiltration into ulcerated gastric tissue enhances the prevention of gastric ulcers in rats (Q. Li et al., 2018). In the present study, blueberry polyphenols (CE, ARFs and NAPFs) reduced MPO activity and protected the histological structure of the gastric mucosa, preventing the infiltration of inflammatory cells (neutrophils). This result provides evidence that blueberry polyphenols have anti-inflammatory effects, with a greater effect for the anthocyanin-rich fraction compared to the non-anthocyanin fraction. These results are in line with previous studies where anthocyanin-rich extracts of *Aronia melanocarpa* (Black Chokeberry) reduced the levels of pro-inflammatory mediators, as MPO in animals with EtOH-induced gastric ulcer (Paulrayer et al., 2017). Interestingly, the anti-inflammatory effects of blueberry NADES extracted polyphenols were comparable to the antiulcer

reference drug, LAN. The proton pump inhibitor LAN has been shown to effectively prevent the expression of MPO in gastric ulcer models (Blandizzi et al., 2005).

\*NO is a signaling molecule that maintains gastric mucosal integrity, however, there is huge evidence that \*NO also contributes to gastric injury during overactivation of inflammatory response (Al-Quraishy et al., 2017). Macrophage migration in the gastrointestinal tract promotes the generation of ROS, which activate proinflammatory cytokines and result in the overexpression of iNOs (inducible nitric oxide synthase) and increased \*NO levels. \*NO reacts with superoxide anion ( $O_2^{\cdot-}$ ) and produce the potent prooxidant peroxynitrite (ONOO<sup>-</sup>), a biologically relevant oxidizing and nitrating agent (Radi, 2004). Accordingly, we observed that EtOH-induced increase in NO levels is accompanied by increased protein oxidation (AOPP levels).

The induction of enzymatic antioxidant defense system is crucial for the homeostatic response against intracellular oxidative stress (Hybertson, Gao, Bose, & McCord, 2011). The beneficial effects of flavonoid compounds in NSAIDs-induced gastric ulcer models has been associated to their ability to activate the Nrf2 pathway (Carrasco-Pozo et al., 2016, Kim et al., 2014). The gastroprotective effect of olive (*Olea europaea*) leaf methanolic extract against gastric lesions induced by HCl/EtOH was mediated by cytoprotective and antioxidant mechanisms attributed to transcriptional activation of various genes implicated in the cell redox balance (Al-Quraishy et al., 2017). Nrf2 is a transcription factor that is sequestered in the cytosol by a Keap1 homodimer. Following the exposure to oxidative stimulus or activation of the MAPK/ERK (p38) pathway, Nrf2 is translocated to the nucleus, where it binds to the antioxidant response element (ARE) and promotes the transcription of antioxidant enzymes (Jung et al., 2010). We were unable to find significant activation of Nrf2

pathway assessed by its translocation to the nucleus in the EtOH-treated rats. Although ethanol is a potent oxidative stress inducer, the short time between ethanol administration and rat euthanasia (1 h) was likely insufficient to promote detectable Nrf2 translocation to the nucleus. In fact, a significant reduction of the Nrf2 cytosolic fraction was detected only when animals were euthanized 3 h after the administration of HCl in an acute gastric mucosal lesion model (Ueda et al., 2008). The pretreatment with blueberry NADES extracts or LAN did not change Nrf2 translocation to the nucleus compared to the control or EtOH-treated rats. However, the possibility that polyphenol treatment may induce translocation of Nrf2 at some earlier time during the treatment cannot be ruled out.

The fermentation of nondigestible carbohydrates by the intestinal microflora yields SFCAs, which have numerous beneficial effects in the intestinal mucosa (Besten et al., 2013). In addition to local effects on the gut, it is believed that SFCAs can influence molecular and cellular processes in systemic level (Levy, Thaiss, & Elinav, 2017). Some studies have shown that polyphenol-rich extracts modulated the activity of gastrointestinal endogenous enzymes as well as the production of SCFAs (Jurgoński, Juśkiewicz, & Zduńczyk, 2013, Fotschki, Juśkiewicz, Sójka, 2015). In the present study, only the pretreatment with ARF increased fecal concentration of acetic acid in EtOH-treated rats. Interestingly, the oral administration of acetate has been recently demonstrated to attenuate the gastric mucosal damage induced by ethanol (J. Liu et al., 2017). Therefore, we propose that the increase in acetate levels is likely responsible for the partial protective effect of anthocyanins against EtOH-induced gastric ulcers.

## 5. Conclusion

The preventive effect of the NADES crude extract of blueberry against EtOH-induced gastric lesions is associated to the mitigation of oxidative stress and neutrophil infiltration. These effects were associated both to the anthocyanin and the non-anthocyanin polyphenol fractions, known for its antioxidative properties. NADES vehicle also contributed to the mitigation of oxidative stress exhibited by the crude blueberry extract but the anthocyanin fraction, which increased fecal SCFA levels, appears to be the sole responsible for preventing GSH depletion and had greater anti-inflammatory effect than the non-anthocyanin fraction. Thus, the consumption of this fruit or NADES blueberry extracts can be further investigated as a nutritional adjuvant strategy in the prevention of the gastric ulcer.

## 6. Acknowledgements

This work was supported by National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) under grant [303654/2017-1] and by Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) under grant [Edital Capes 27/2010 - Pró-Equipamentos Institucional].

## 7. References

- Adinortey, M. B., Ansah, C., Galyuon, I., & Nyarko, A. (2013). *In Vivo* Models Used for Evaluation of Potential Antigastroduodenal Ulcer Agents. *Ulcers*, 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/796405>
- Agnihotri, N., Kaur, H., Kaur, N., & Sarotra, P. (2007). Role of oxidative stress in lansoprazole-mediated gastric and hepatic protection in Wistar rats. *Indian Journal of Gastroenterology: Official Journal of the Indian Society of Gastroenterology*, 26(3), 118–21. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17704577>
- Al-Quraishy, S., Othman, M. S., Dkhil, M. A., & Abdel Moneim, A. E. (2017). Olive (*Olea europaea*) leaf methanolic extract prevents HCl/ethanol-induced gastritis in rats by attenuating inflammation and augmenting antioxidant enzyme activities.

*Biomedicine and Pharmacotherapy*, 91, 338–349.  
<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.04.069>

Bartosz Fotschki, Jerzy Juśkiewicz, Michał Sójka, A. J. Źnki and Z. Z. nczyk. (2015). Ellagitannins and Flavan-3-ols from Raspberry Pomace Modulate Caecal Fermentation Processes and Plasma Lipid Parameters in Rats, 22848–22862.  
<https://doi.org/10.3390/molecules201219878>

Besten, G. Den, Eunen, K. Van, Groen, A. K., Venema, K., Reijngoud, D., & Bakker, B. M. (2013). The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism, 54, 2325–2340.  
<https://doi.org/10.1194/jlr.R036012>

Birben, E., Murat, U., Md, S., Sackesen, C., Erzurum, S., & Kalayci, O. (2012). Oxidative Stress and Antioxidant Defense. *WAO Journal*, 5(January), 9–19.  
<https://doi.org/10.1097/WOX.0b013e3182439613>

Blandizzi, C., Fornai, M., Colucci, R., Natale, G., Lubrano, V., Vassalle, C., ... Del Tacca, M. (2005). Lansoprazole prevents experimental gastric injury induced by non-steroidal anti-inflammatory drugs through a reduction of mucosal oxidative damage. *World Journal of Gastroenterology*, 11(26), 4052–4060.

Bochi, V. C., Godoy, H. T., & Giusti, M. M. (2015). Anthocyanin and other phenolic compounds in Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) fruits. *Food Chemistry*, 176, 234–43. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.12.041>

Bryan, H. K., Olayanju, A., Goldring, C. E., & Park, B. K. (2013). The Nrf2 cell defence pathway: Keap1-dependent and -independent mechanisms of regulation. *Biochemical Pharmacology*, 85(6), 705–717.  
<https://doi.org/10.1016/j.bcp.2012.11.016>

Cadirci, E., Suleyman, H., Aksoy, H., Halici, Z., Ozgen, U., Koc, A., & Ozturk, N. (2007). Effects of *Onosma armeniacum* root extract on ethanol-induced oxidative stress in stomach tissue of rats. *Chemico-Biological Interactions*, 170(1), 40–48.  
<https://doi.org/10.1016/j.cbi.2007.06.040>

Carlberg, I., & Manner, B. (1979). Inhibition of glutathione reductase by interaction of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate with the active-site dithiol. *FEBS Letters*, 98(2), 263–266.

Carrasco-Pozo, C., Castillo, R. L., Beltrán, C., Miranda, A., Fuentes, J., & Gotteland, M. (2016). Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: Role of NF-κB and Nrf2. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 27, 289–298.  
<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2015.09.016>

Correa-Betanzo, J., Allen-Vercoe, E., McDonald, J., Schroeter, K., Corredig, M., & Paliyath, G. (2014). Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. *Food Chemistry*, 165, 522–531. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.05.135>

Cvjetko Bubalo, M., Čurko, N., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., & Radojčić Redovniković, I. (2016). Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. *Food Chemistry*, 200, 159–166. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.01.040>

Cvjetko Bubalo, M., Vidović, S., Radojčić Redovniković, I., & Jokić, S. (2015). Green solvents for green technologies. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 90(9), 1631–1639. <https://doi.org/10.1002/jctb.4668>

Faggian, M., Sut, S., Perissutti, B., Baldan, V., Grabnar, I., & Acqua, S. D. (2016). Natural Deep Eutectic Solvents ( NADES ) as a Tool for Bioavailability Improvement : Pharmacokinetics of Rutin Dissolved in Proline / Glycine after Oral Administration in Rats : Possible Application in Nutraceuticals, 1–11. <https://doi.org/10.3390/molecules21111531>

Franke, A., Teysse, S., & Singer, M. V. (2006). Alcohol-related diseases of the esophagus and stomach. *Digestive Diseases*, 23(3–4), 204–213. <https://doi.org/10.1159/000090167>

Freedberg, D. E., Kim, L. S., & Yang, Y. X. (2017). The Risks and Benefits of Long-term Use of Proton Pump Inhibitors: Expert Review and Best Practice Advice From the American Gastroenterological Association. *Gastroenterology*, 152(4), 706–715. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2017.01.031>

Ganguly A. K. (1969). “A method for quantitative assessment of experimentally produced ulcers in the stomach of albino rats. *Experientia*, 25, 1224.

Grisham, M. B., Hernandez, L. a, & Granger, D. N. (1986). Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. *The American Journal of Physiology*, 251(4 Pt 1), G567–G574. Retrieved from <http://ajpgi.physiology.org/content/ajpgi/251/4/G567.full.pdf>

Habig, W.H., Pabst, M.J. and Jakoby, W. B. (1974). Glutathione S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. *Journal of Biological Chemistry*, 249, 7130–7139.

Hanasand, M., Omdal, R., Norheim, K. B., Gøransson, L. G., Brede, C., & Jonsson, G. (2012). Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. *Clinica Chimica Acta*, 413(9–10), 901–906. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2012.01.038>

Hissin, P. J., & Hilf, R. (1976). A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical Biochemistry*, 74(1), 214–26. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90326-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90326-2)

Hybertson, B. M., Gao, B., Bose, S. K., & McCord, J. M. (2011). Oxidative stress in health and disease: The therapeutic potential of Nrf2 activation. *Molecular Aspects of Medicine*, 32(4–6), 234–246. <https://doi.org/10.1016/j.mam.2011.10.006>

Jabri, M. A., Rtibi K., Tounsi, H., Hosni, K., Saklya, M., & Sebaia, L. M. (2016). No

Fatty acids composition and mechanism of protective effects of myrtle berries seeds aqueous extract against alcohol-induced peptic ulcer in rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 1–43.

Jung, K. H., Hong, S. W., Zheng, H. M., Lee, H. S., Lee, H., Lee, D. H., ... Hong, S. S. (2010). Melatonin ameliorates cerulein-induced pancreatitis by the modulation of nuclear erythroid 2-related factor 2 and nuclear factor-kappaB in rats. *Journal of Pineal Research*, 48(3), 239–250. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2010.00748.x>

Jurgoński, A., Juśkiewicz, J., & Zduńczyk, Z. (2013). An anthocyanin-rich extract from Kamchatka honeysuckle increases enzymatic activity within the gut and ameliorates abnormal lipid and glucose metabolism in rats. *Nutrition*, 29(6), 898–902. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2012.11.006>

Kalia, K., Sharma, K., Singh, H. P., & Singh, B. (2008). Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lod. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 10129–10134.

Kim, S. J., Kim, J. M., Shim, S. H., & Chang, H. I. (2014). Anthocyanins accelerate the healing of naproxen-induced gastric ulcer in rats by activating antioxidant enzymes via modulation of Nrf2. *Journal of Functional Foods*, 7(1), 569–579. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.12.028>

Kim, S. J., Lee, H. J., Kim, B. S., Lee, D., Lee, S. J., Yoo, S. H., & Chang, H. I. (2011). Antiulcer activity of anthocyanins from *Rubus coreanus* via association with regulation of the activity of matrix metalloproteinase-2. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(21), 11786–11793. <https://doi.org/10.1021/jf104192a>

Lauret ME, Rodriguez-Peláez M, P. I. and, & L, R. (2015). Peptic Ulcer Disease. *Austin Journal of Gastroenterology*, 2(5), 1055.

Levy, M., Thaïss, C. A., & Elinav, E. (2016). Metabolites: messengers between the microbiota and the immune system. *Genes Development*, 30(14), 1589–1597.

Li, C. Y., Xu, H. De, Zhao, B. T., Chang, H. I., & Rhee, H. I. (2008). Gastroprotective effect of cyanidin 3-glucoside on ethanol-induced gastric lesions in rats. *Alcohol*, 42(8), 683–687. <https://doi.org/10.1016/j.alcohol.2008.08.009>

Li, Q., Hu, X., Xuan, Y., Ying, J., Fei, Y., Rong, J., ... Liu, Z. (2018). Kaempferol protects ethanol-induced gastric ulcers in mice via pro-inflammatory cytokines and NO. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, (February), 1–8. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmy002>

Li, W. F., Hao, D. J., Fan, T., Huang, H. M., Yao, H., & Niu, X. F. (2014). Protective effect of chelerythrine against ethanol-induced gastric ulcer in mice. *Chemico-Biological Interactions*, 208(1), 18–27. <https://doi.org/10.1016/j.cbi.2013.11.011>

Liu, J., Wang, J., Shi, Y., Su, W., Chen, J., Zhang, Z., ... Wang, F. (2017). Short Chain Fatty Acid Acetate Protects against Ethanol-Induced Acute Gastric Mucosal



Lesion in Mice, *40*(9), 1439–1446.

Liu, Y., Liang, J., Wu, J., Chen, H., Zhang, Z., & Yang, H. (2017). Transformation of patchouli alcohol to  $\beta$ -patchoulene by gastric juice :  $\beta$ -patchoulene is more effective in preventing ethanol-induced gastric injury. *Scientific Reports*, (January), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05996-5>

Miranda, K. M., Espey, M. G., & Wink, D. A. (2001). A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. *Nitric Oxide*, *5*(1), 62–71. <https://doi.org/10.1006/niox.2000.0319>

Mojzer, E. B., Hrcic, M. K., Skerget, M., Knez, Z., & Bren, U. (2016). Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. *Molecules*, *21*(7), 1–38. <https://doi.org/10.3390/molecules21070901>

Mota, C. S., Freitas, R. B., Athayde, M. L., Boligon, A. A., Augusti, P. R., Somacal, S., ... Bauermann, L. F. (2011). Effect of *Vernonia cognata* on oxidative damage induced by ethanol in rats. *Human and Experimental Toxicology*, *30*(7), 675–684. <https://doi.org/10.1177/0960327110377646>

Nagulsamy, P., Ponnusamy, R., & Thangaraj, P. (2015). Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and antiulcer properties of *Vaccinium leschenaultii* Wight: A therapeutic supplement. *Journal of Food and Drug Analysis*, *23*(3), 376–386. <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2014.11.003>

Nishida, K., Ohta, Y., & Ishiguro, I. (1998). Contribution of NO synthases to neutrophil infiltration in the gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. *FEBS Letters*, *425*(2), 243–8. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(98\)00237-3](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(98)00237-3)

Norberto S., Silva S., Meireles M., Faria A., Pintado M, C. C. (2013). Blueberry anthocyanins in health promotion: A métabolic overview. *Function Foods*, *5*, 1518–1528.

Ogawa, K., Oyagi, A., Tanaka, J., Kobayashi, S., & Hara, H. (2011). The protective effect and action mechanism of *vaccinium myrtillus* L. on gastric ulcer in mice. *Phytotherapy Research*, *25*(8), 1160–1165. <https://doi.org/10.1002/ptr.3413>

Paglia, D. E., & Valentine, W. N. (1967). Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, *70*, 158–169.

Paulrayer, A., Adithan, A., Lee, J. H., Moon, K. H., Kim, D. G., Im, S. Y., ... Kim, J. H. (2017). *Aronia melanocarpa* (Black chokeberry) reduces ethanol-induced gastric damage via regulation of HSP-70, NF- $\kappa$ b, and MCP-1 signaling. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(6). <https://doi.org/10.3390/ijms18061195>

Radi, R. (2004). Nitric oxide, oxidants, and protein tyrosine nitration. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *101*(12), 4003–4008. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307446101>

Radošević, K., Ćurko, N., Gaurina Srček, V., Cvjetko Bubalo, M., Tomašević, M., Kovačević Ganić, K., & Radojčić Redovniković, I. (2016). Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. *LWT - Food Science and Technology*, *73*, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.037>

Robert A. (1979). Cytoprotection by Prostaglandins. *Gastroenterology*, *77*, 761–767.

Rodriguez-Saona, L. E., & Wrolstad, R. E. (2001). Extraction , Isolation , and Purification of. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F1.1.1. <https://doi.org/10.1007/978-1-61779-624-1>

Schubert, M. L., & Peura, D. A. (2008). Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. *Gastroenterology*, *134*(7), 1842–1860. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2008.05.021>

Shaker, E., Mahmoud, H., & Mnaa, S. (2010). Anti-inflammatory and anti-ulcer activity of the extract from *Alhagi maurorum* (camelthorn). *Food and Chemical Toxicology*, *48*(10), 2785–2790. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2010.07.007>

Spitz, D. R., & Oberley, L. W. (1989). An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. *Analytical Biochemistry*, *179*(1), 8–18. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(89\)90192-9](https://doi.org/10.1016/0003-2697(89)90192-9)

Stedman, C. A. M., & Barclay, M. L. (2000). Review article: Comparison of the pharmacokinetics, acid suppression and efficacy of proton pump inhibitors. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, *14*(8), 963–978. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2036.2000.00788.x>

Ueda, K., Ueyama, T., Yoshida, K., Kimura, H., Ito, T., Shimizu, Y., ... Ichinose, M. (2008). Adaptive HNE-Nrf2-HO-1 pathway against oxidative stress is associated with acute gastric mucosal lesions. *American Journal of Physiology. Gastrointestinal and Liver Physiology*, *295*(3), G460–G469. <https://doi.org/10.1152/ajpgi.00204.2007>

Wang, H., Guo, X., Hu, X., Li, T., Fu, X., & Liu, R. H. (2017). Comparison of phytochemical profiles, antioxidant and cellular antioxidant activities of different varieties of blueberry (*Vaccinium* spp.). *Food Chemistry*, *217*, 773–781. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.09.002>

Zhao, G., Nyman, M., & Jönsson, J. Å. (2006). Rapid determination of short-chain fatty acids in colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. *Biomedical Chromatography*, *20*(8), 674–682. <https://doi.org/10.1002/bmc.580>

Zitka, O., Skalickova, S., Gumulec, J., Masarik, M., Adam, V., Hubalek, J., ... Kizek, R. (2012). Redox status expressed as GSH:GSSG ratio as a marker for oxidative stress in paediatric tumour patients. *Oncology Letters*, *4*(6), 1247–1253. <https://doi.org/10.3892/ol.2012.931>

## Figure captions

Figure 1: Experimental design. CE = Crude extract of blueberry; ARFs = Anthocyanins-rich fractions; NAPFs = Non-anthocyanic phenolic fractions; LAN = Lansoprasole; EtOH= Ethanol.

Figure 2. Effect of blueberry CE and your anthocyanins and non-anthocyanic polyphenols fractions in appearance macroscopic of stomach. Index ulcer (A) and % protection ulceration (B) (means  $\pm$  SEM, n=7). Note ulcerations with hemorrhagic craters (arrowheads -  $\blacktriangle$  ). CE = Crude extract of blueberry; ARFs = Anthocyanins-rich fractions; NAPFs = Non-anthocyanic phenolic fractions; LAN = Lansoprasole; EtOH= Ethanol. \*Different from the control group ( $p<0.05$ ), #Different from the water group ( $p<0.05$ ).

Figure 3. Representative histology of the stomach tissue from: Control (A); Water (B); CE (C); ARFs (D); NAPFs (E); LAN (F). Note inflammatory neutrophil infiltration (circles), structural loss of tissue (arrowheads -  $\blacktriangle$ ) and hyperemia (arrowheads -  $\blacktriangle$ ). M = Mucosa; Stomach sections were stained with hematoxylin and eosin. (Scale bar 150x). ARFs = Anthocyanins-rich; CE = Crude extract of blueberry; fractions; EtOH= Ethanol; LAN = Lansoprasole; NAPFs = Non-anthocyanic phenolic fractions.

Figure 4. Effect of blueberry CE and your anthocyanins and non-anthocyanic polyphenols fractions in AOPP (A) and  $\text{NO}_x$  levels (B) (means  $\pm$  SEM, n=8), and GSH/GSSG ratio (C) (means  $\pm$  SEM, n=4). AOPP = advanced oxidation protein products;  $\text{NO}_x$  = nitrite and nitrate levels. GSH = glutathione reduced, GSSG = glutathione oxidized; ARFs = Anthocyanins-rich; CE = Crude extract of blueberry;

fractions; EtOH= Ethanol; LAN = Lansoprasole; NAPFs = Non-anthocyanic phenolic fractions. \*Different from the Control group ( $p<0.05$ ), #Different from the Water group ( $p<0.05$ ).

Figure 5. Effect of blueberry CE and your anthocyanins and non-anthocyanic polyphenols fractions in SOD (A), GR (B), GST (C), GPx (D) (means  $\pm$  SEM,  $n=8$ ). SOD = superoxide dismutase; GR = glutathione reductase; GST = glutathione-S-transferase; GPx = glutathione peroxidase; ARFs = Anthocyanins-rich; CE = Crude extract of blueberry; fractions; EtOH= Ethanol; LAN = Lansoprasole; NAPFs = Non-anthocyanic phenolic fractions. \*Different from the Control group ( $p<0.05$ ), #Different from the Water group ( $p<0.05$ ).

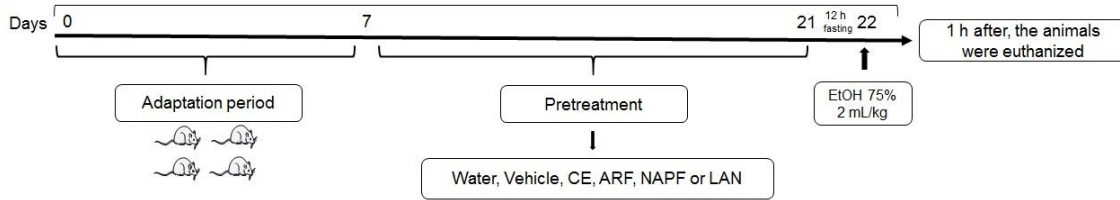
Figure 6. Effect of blueberry CE and your anthocyanins and non-anthocyanic polyphenols fractions on Nrf2 translocation in gastric mucosa. Representative blots of cytosolic and nuclear Nrf2,  $\beta$ -actin and lamin-B1 expression (A) and Cytosolic/Nuclear Nrf2 content ratio (B); ARFs = Anthocyanins-rich; CE = Crude extract of blueberry; fractions; EtOH= Ethanol; LAN = Lansoprasole; NAPFs = Non-anthocyanic phenolic fractions. \*Different from the Control group ( $p<0.05$ ), #Different from the Water group ( $p<0.05$ ).

Figure 7. Effect of blueberry CE and your anthocyanins and non-anthocyanic polyphenols fractions in MPO activity (means  $\pm$  SEM,  $n=4$ ). MPO = myeloperoxidase activity; ARFs = Anthocyanins-rich; CE = Crude extract of blueberry; fractions; EtOH= Ethanol; LAN = Lansoprasole; NAPFs = Non-anthocyanic phenolic fractions. \*Different from the Control group ( $p<0.05$ ), #Different from the Water group ( $p<0.05$ ).

Figure 8. Effect of blueberry CE and your anthocyanins and non-anthocyanic polyphenols fractions in short-chain fatty acids. Acetic acid (A), Propionic acid (B) and Butyric acid (C); ARFs = Anthocyanins-rich; CE = Crude extract of blueberry; fractions; EtOH= Ethanol; LAN = Lansoprasole; NAPFs = Non-anthocyanic phenolic fractions. \*Different from the Control group ( $p < 0.05$ ), #Different from the Water group ( $p < 0.05$ )

Figure 1:

Ethanol-treated groups:



Control group:

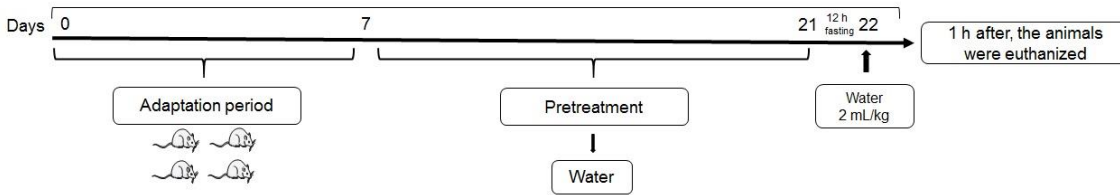


Figure 2:

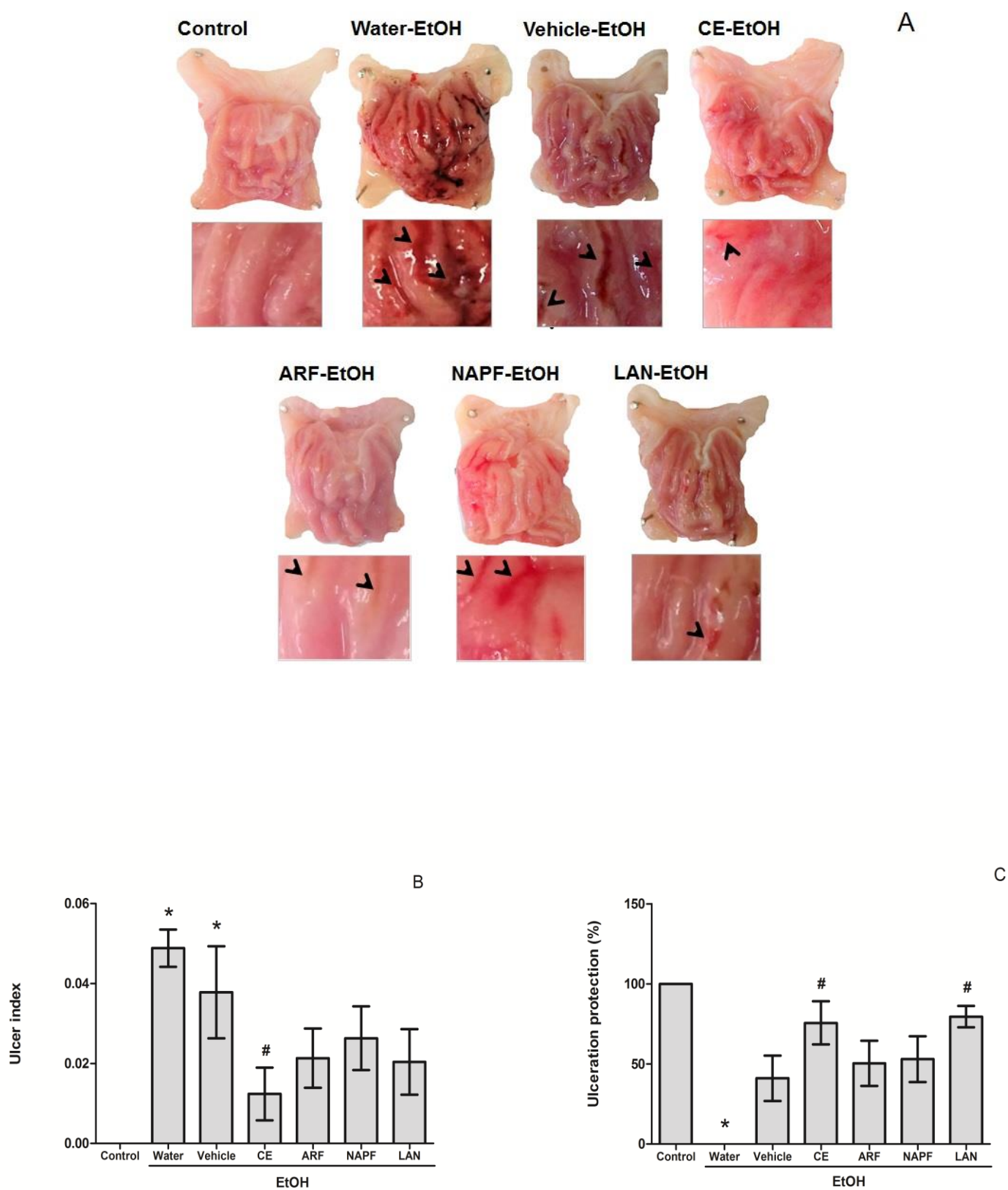


Figure 3:

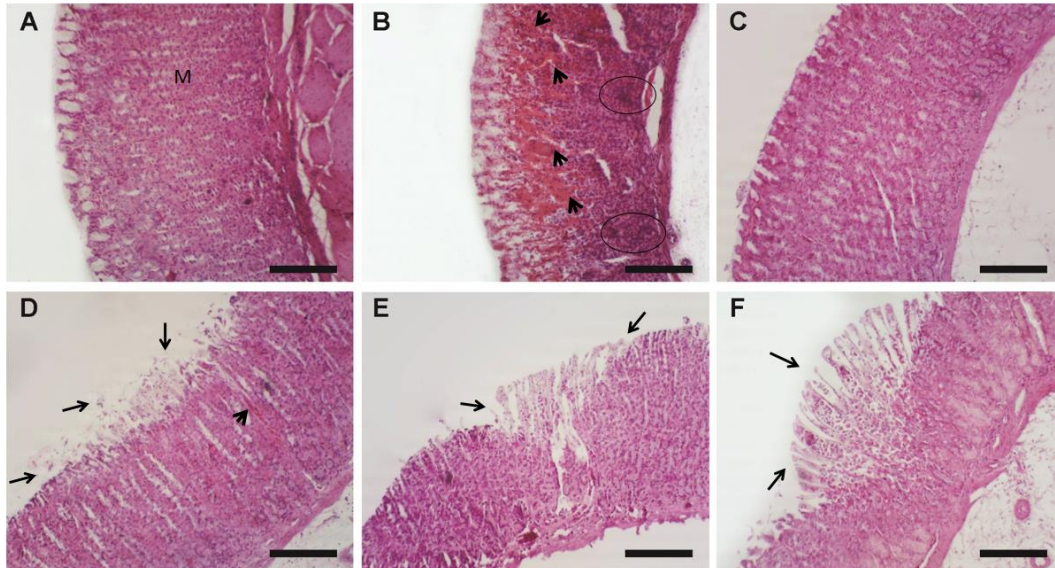




Figure 4:

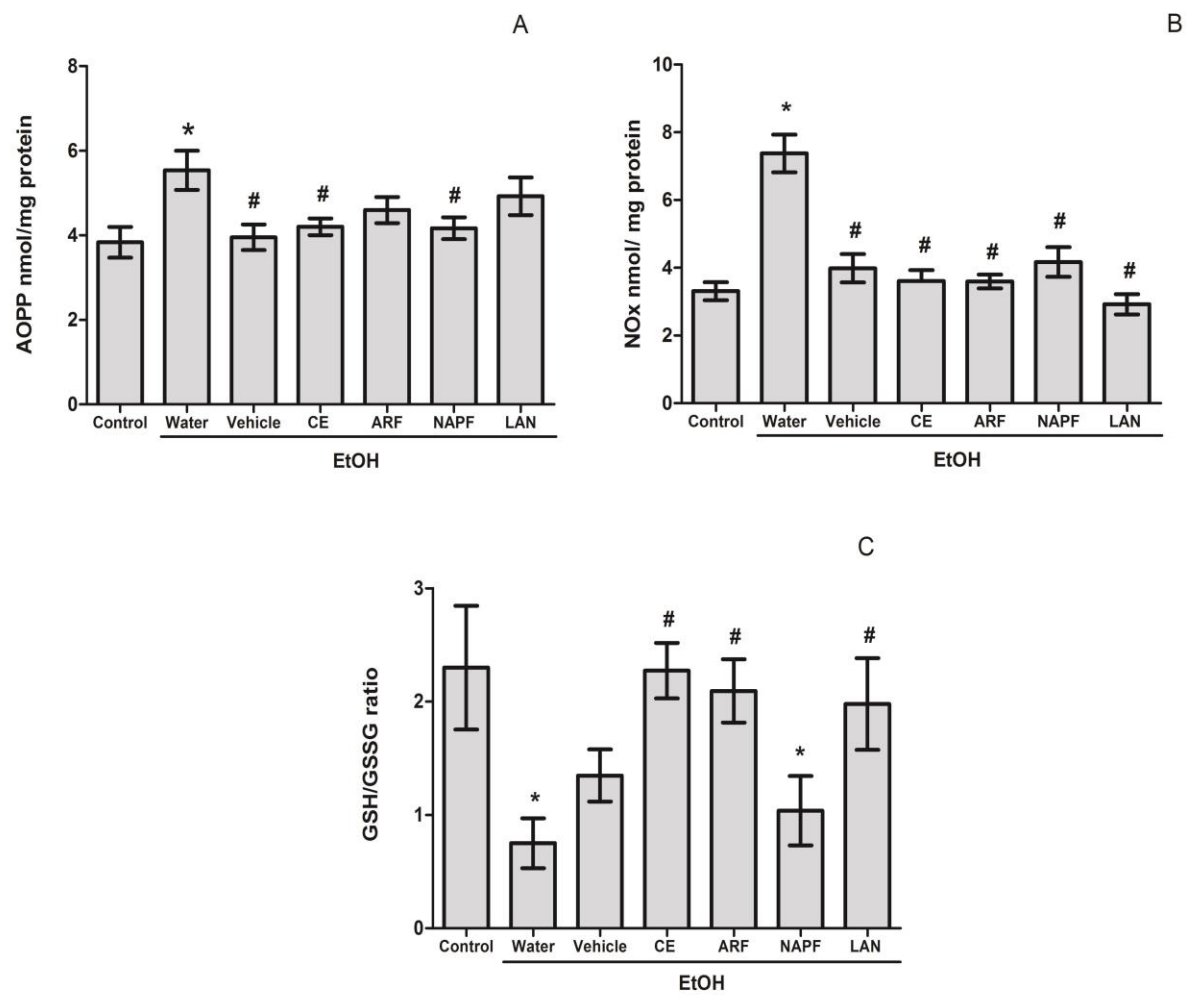


Figure 5:

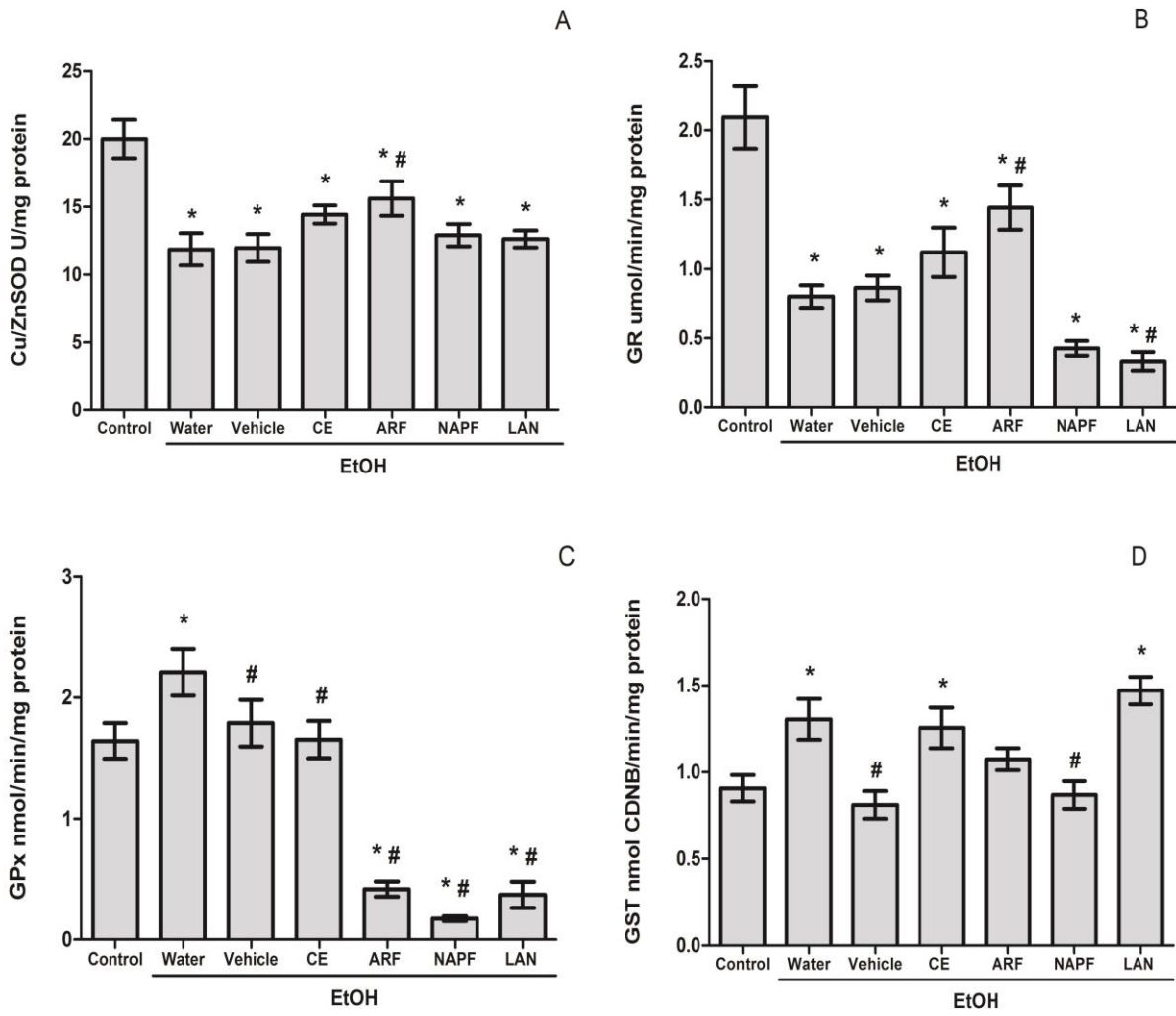


Figure 6:

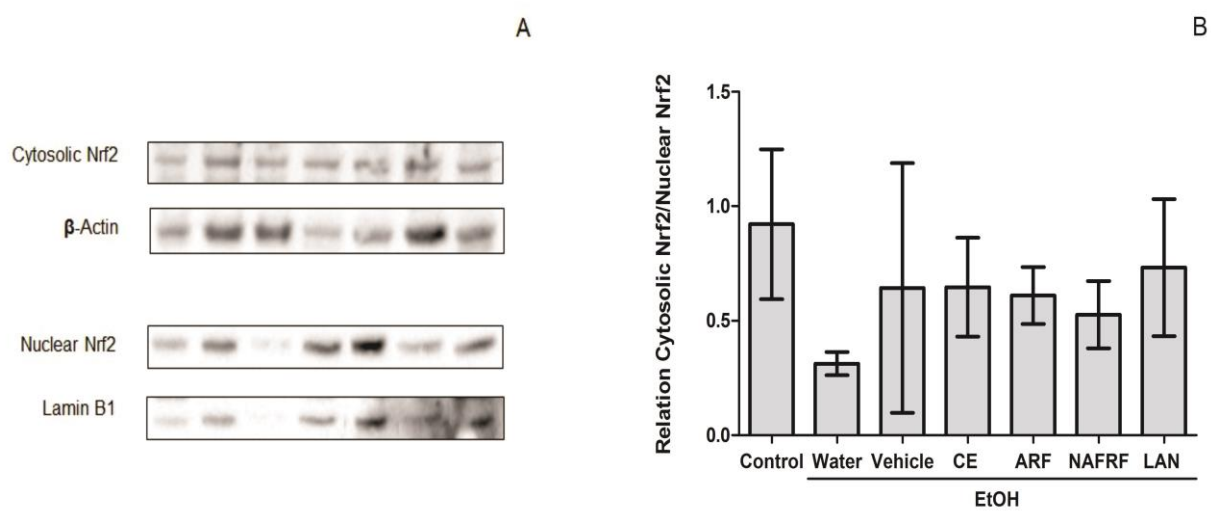


Figure 7:

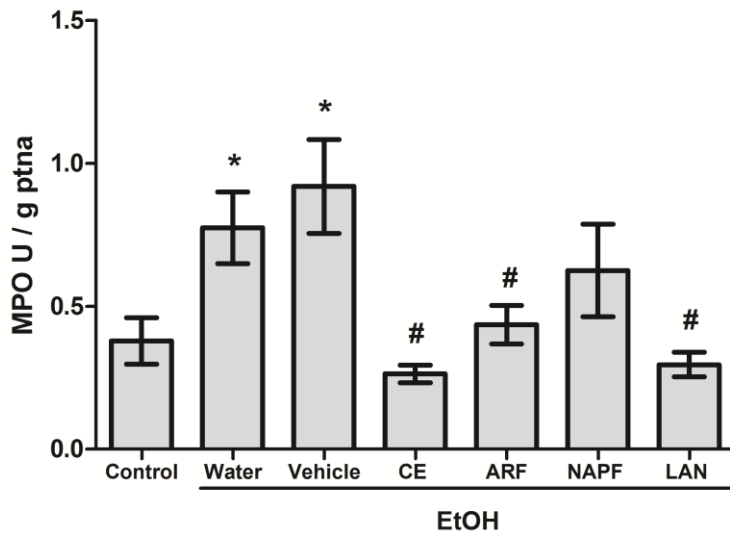
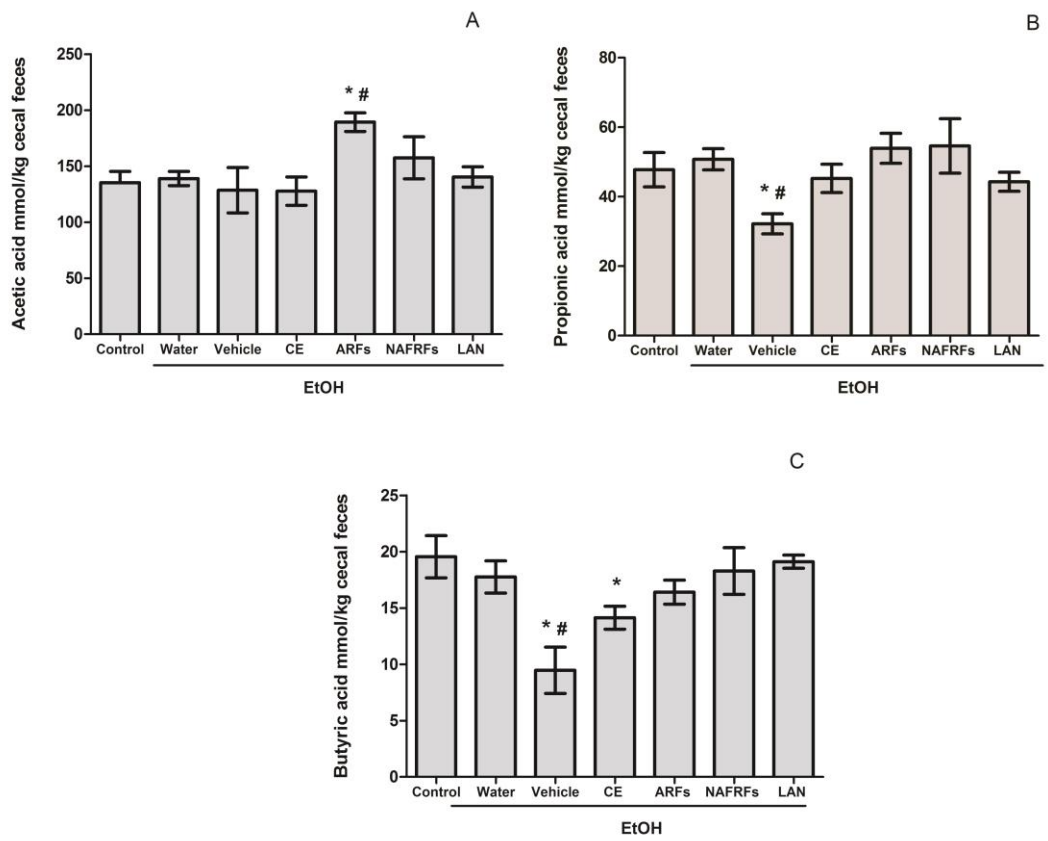


Figure 8:



### 3 DISCUSSÃO

A úlcera gástrica é uma desordem gastrointestinal complexa e multifatorial que está intimamente relacionada com eventos oxidativos, inflamatórios e apoptóticos (LIANG et al., 2018). As principais terapias medicamentosas para a úlcera gástrica visam inibir a secreção de HCl pelas células parietais (inibidores da bomba de prótons, antagonistas do receptor de histaminas) ou ainda neutralizar parcialmente o ácido já produzido (antiácidos) (FREEDBERG; KIM; YANG, 2017). No entanto, devido aos efeitos colaterais dos tratamentos disponíveis na clínica, a busca por novas terapias e compostos naturais que possam atuar na prevenção e/ou tratamento da úlcera gástrica, especialmente desprovidas de efeito tóxico, têm crescido nas últimas décadas.

Nesse intuito, nós primeiramente investigamos o uso de NADES, uma nova alternativa verde de extração, para a obtenção de compostos biativos como as antocianinas do mirtilo. Posteriormente, tendo em vista que o estresse oxidativo é um dos principais agravantes do quadro clínico da úlcera gástrica e a excelente capacidade antioxidante dos polifenóis do mirtilo, exemplificada pelo seu alto poder de sequestro de radicais livres (PRIOR et al., 1998; HIDALGO; ALMAJANO, 2017) avaliamos a atividade biológica do extrato de mirtilo, obtido através da melhor razão de solvente NADES, em modelo de úlcera gástrica em ratos.

No presente estudo, utilizamos um modelo experimental multivariado denominado simplex centroide para encontrarmos a melhor combinação de componentes (cloreto de colina:glicerol:ácido cítrico) para a extração das antocianinas do mirtilo. Para isso, desenvolvemos dez misturas extratoras NADES onde foram testadas todas as proporções possíveis (0-100%) dos componentes cloreto de colina:glicerol:ácido cítrico (ChCl:gli:ácido cítrico). Embora o planejamento de misturas não tenha encontrado um ponto ótimo no sistema estudado, a mistura contendo ChCl:gli:ácido cítrico na proporção molar de 0,5:2:0,5 (NADES 9) foi capaz de extrair cerca de 76% das antocianinas do mirtilo, quando comparada à metodologia que utiliza solventes orgânicos para extração exaustiva de compostos da matriz (PERTUZATTI et al., 2016). Além disso, NADES 9 foi tão eficiente quanto o solvente orgânico quando comparados na mesma proporção amostra:solvente.

Além do rendimento satisfatório, as frações ricas em antocianinas obtidas com NADES apresentaram capacidade antioxidante avaliadas pelo método de ORAC e FRAP superiores as frações obtidas com solvente orgânico e água:ácido cítrico 1%. Foram encontradas correlações positivas entre o conteúdo de antocianinas e a capacidade antioxidante, para ambos os métodos. O conteúdo de antocianinas parece estar intimamente

relacionado com os valores de FRAP, contudo a maior atividade antioxidante do extrato NADES, observada no ensaio de ORAC, não pode ser explicada somente pelo conteúdo de antocianinas.

Neste trabalho demonstramos pela primeira vez que a mistura ternária NADES 9 produz extratos com proporção maior de antocianinas arabinosídicas e menor proporção de antocianinas glicosídicas e galactosídicas do que o solvente orgânico. Dessa forma, as frações enriquecidas com antocianinas arabinosídicas, com potencial antioxidante superior as glicosídicas e galactosídicas já relatado na literatura (CHORFA; SAVARD; BELKACEMI, 2016), provavelmente contribuíram para a maior capacidade em remover os radicais de oxigênio (ORAC) da fração antocianina obtida com NADES, comparado a fração extraída com solvente orgânico.

Para a utilização do NADES como solução extratora e veículo em um experimento *in vivo*, adicionalmente aos resultados da literatura que comprovam baixa toxicidade destes solventes (RADOŠEVIĆ et al., 2016), comparou-se as doses dos constituintes do NADES com a dose (nível) onde não se observa efeito adverso (NOAEL) para cada componente da solução NADES. De acordo com os resultados obtidos, as doses de cloreto de colina, glicerol e ácido cítrico na mistura NADES 9 no extrato bruto de mirtilo e no veículo (0,71 g/kg peso corporal - p.c.; 1.79 g/kg p.c.; 1.07 g/kg p.c., respectivamente) são inferiores aos valores de NOAEL estabelecidos pela literatura (> 0,5 g/kg p.c.; 5 g/kg p.c.; 5 g/kg p.c., respectivamente) (SHIVAPURKAR; HOOVER; POIRIER, 1986; GUERRANT et al., 1947; COMMITTEE; SCCP, 2009).

A partir disso, a mistura NADES 9 foi utilizada para produzir um extrato bruto de mirtilo e determinar, através de um ensaio piloto, a dose de polifenóis totais mais eficaz na prevenção de úlcera gástrica induzida pelo etanol. Neste ensaio foram testadas doses de extrato bruto de mirtilo contendo 5, 10 e 15 mg de polifenóis totais/kg de p.c. Os resultados obtidos indicaram uma tendência de redução do índice de úlcera gástrica com a administração da dose de 10 mg/kg, porém sem alterações estatisticamente significativas entre os grupos (Figura 1, anexo A). Dados histológicos revelaram que a dose de 10 mg/kg p.c. resultou em maior preservação estrutural do tecido gástrico e raras ulcerações hemorrágicas (dados não apresentados). Além disso, o tratamento durante 14 dias com 10 mg/kg aumentou os níveis de tióis não proteicos (Figura 1, anexo B), a atividade da enzima CAT (Figura 1, anexo B) e preveniu parcialmente o aumento da atividade da SOD (Figura 1, anexo B). Com base nestes resultados preliminares, selecionamos a dose intermediária de 10 mg/kg como potencialmente capaz de prevenir a formação de úlceras gástricas induzidas por etanol.

Alguns estudos já avaliaram o potencial gastroprotetor do extrato bruto do mirtilo (OGAWA et al., 2011; NAGULSAMY; PONNUSAMY; THANGARAJ, 2015), no entanto ainda não foi identificada a fração de compostos fenólicos responsável pelos efeitos biológicos. Em nosso estudo, observamos que o etanol induz a formação de úlceras hemorrágicas e que o pré-tratamento com EB de mirtilo previne a formação dessas lesões bem como, preserva a estrutura glandular da mucosa gástrica mais do que o tratamento referência com lansoprazol (30 mg/kg p.c.). Vale ressaltar que as frações estudadas foram menos eficientes que o EB, demonstrando que a maior proteção da mucosa gástrica pelo EB pode ser atribuída a um efeito sinérgico dos polifenóis presentes no mirtilo. Dessa forma, acredita-se que as antocianinas e os compostos fenólicos não antociânicos do EB, obtidos através do NADES apresentaram resultados vantajosos, pois além da extração com NADES ser biosustentável e economicamente viável, o extrato obtido foi biocompatível e promoveu efeito gastroprotetor.

No presente estudo, os animais expostos ao etanol tiveram um aumento nos níveis de AOPP, NO<sub>x</sub> e depleção de GSH o que caracteriza um dano oxidativo na mucosa gástrica. Todos os pré-tratamentos, incluindo o veículo atenuaram o estresse oxidativo indicando um possível efeito *per se* do NADES. Além disso, os polifenóis do mirtilo (antocianinas e fenólicos não antociânicos) foram capazes de prevenir os danos teciduais induzidos pelo etanol. Os efeitos antioxidantes demonstrados pelos polifenóis na prevenção do dano oxidativo podem ser atribuídos a excelente capacidade de eliminação direta das ERs. Já o efeito do NADES pode ser explicado pelos próprios componentes da mistura, uma vez que o ácido cítrico é amplamente utilizado como antioxidante na indústria alimentícia devido a sua capacidade de ligar metais de transição reduzindo a ação catalítica destes nas reações de oxidação (GROMOVAYA; SHAPOVAL; MIRONYUK, 2002).

O papel do estresse oxidativo no processo de úlcera gástrica induzida pelo etanol foi confirmado através avaliação da atividade dos sistemas de defesa antioxidantes. O aumento da atividade enzimática da GPx e GST juntamente com a redução da atividade da GR promoveu a depleção de GSH. A fração de antocianinas parece ser a responsável pelo efeito protetor do EB contra a depleção de GSH. Além disso, as frações antociânicas preveniram parcialmente a redução da atividade da SOD e GR. Estes resultados confirmam a excelente capacidade antioxidante da fração de antocianinas obtida com solvente NADES no primeiro manuscrito, mas sugerem que além da capacidade de remoção direta de espécies reativas, o tratamento com antocianinas por 14 dias modula a atividade de enzimas antioxidantes.



Com o intuito de desvendar o envolvimento dos polifenóis em um mecanismo de modulação da resposta antioxidante, avaliamos a expressão do Nrf2, um fator de transcrição responsável pela expressão de enzimas antioxidantes. Contrariando o esperado, o tratamento com EB e suas frações não aumentou a translocação do Nrf2 para o núcleo, local onde o Nrf2 liga-se ao ARE e aumenta a expressão de importantes enzimas envolvidas na remoção de espécies reativas e eletrofílicas (LEE et al., 2013). No entanto, não se pode descartar o envolvimento desta via em algum momento anterior durante este estudo, já que trata-se de um período de tratamento relativamente longo (14 dias) comparando-se ao encontrado na literatura (AL-QURAIHY et al., 2017; CARRASCO-POZO et al., 2016; LUO et al., 2018).

A resposta inflamatória é um fator inevitável em úlceras gástricas induzidas pelo etanol, evidenciado pelo aumento da expressão de citocinas pró-inflamatórias e infiltração leucocitária (LIANG et al., 2018). A MPO é abundantemente expressa em neutrófilos e dessa forma é considerada um importante marcador inflamatório. Em nosso estudo, a exposição ao etanol aumentou a atividade da MPO e o tratamento com EB e suas frações preveniram o aumento deste marcador. Neste caso, o efeito anti-inflamatório promovido pelos polifenóis foi atribuído especialmente a fração antociânica devido ao efeito protetor parcial dos compostos fenólicos não antociânicos.

Outro possível mecanismo de ação recentemente evidenciado para os polifenóis é a modulação da produção de ácidos graxos de cadeia curta no intestino grosso. Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) acetato, propionato e butirato são os principais produtos da fermentação bacteriana de fibras dietéticas não digeríveis. Dentre eles, o acetato já apresentou benefícios na prevenção de úlceras gástricas induzidas por etanol (LIU et al., 2017a). Alguns estudos têm demonstrado que as antocianinas podem atingir a parte inferior do trato intestinal e alterar o metabolismo microbiano (JURGOŃSKI; JUŚKIEWICZ; ZDUŃCZYK, 2013). Nossos resultados indicam que o tratamento com a fração de antocianinas aumentou a produção de acetato, um dos AGCC mais abundantes. Dessa forma, pode-se sugerir um possível mecanismo de ação para as antocianinas, já que além de modularem o crescimento de flora intestinal (PARKAR; TROWER; STEVENSON, 2013) podem estar alterando os produtos da fermentação bacteriana, como os AGCC.

Baseado nos resultados apresentados neste trabalho, podemos destacar o efeito promissor do NADES na extração de compostos bioativos do mirtilo bem como a biocompatibilidade do extrato bruto de mirtilo a base de NADES na prevenção de lesões gástricas induzidas por etanol. Além disso, salienta-se o papel antioxidante das frações ricas em antocianinas tanto *in vitro* como *in vivo* demonstrado em ambos os manuscritos. Vale

destacar ainda que esse é o primeiro estudo avaliando o efeito bioativo de extratos de mirtilo a base de NADES como uma estratégia adjuvante na prevenção da úlcera gástrica induzida por etanol.

#### 4 CONCLUSÃO

Desenvolvendo um solvente NADES biossustentável para a extração de compostos bioativos do mirtilo com posterior aplicação em modelo de úlcera gástrica induzida concluímos que:

✓ A proporção molar 0,5:2:0,5 da mistura ternária cloreto de colina:glicerol:ácido cítrico (NADES 9) foi a mais eficiente na extração das antocianinas do mirtilo, resultando em um rendimento de 76% quando comparado com uma extração exaustiva usando solvente orgânico, além de apresentar eficiência similar ao solvente orgânico quando comparado na mesma proporção amostra:solvente;

✓ O extrato obtido usando NADES 9 apresentou maior proporção de antocianinas arabinosídicas e menor proporção de antocianinas galactosídicas e glicosídicas do que o extrato obtido usando solvente orgânico;

✓ A fração de antocianinas purificadas obtida a partir do mirtilo usando NADES 9 mostrou maior capacidade antioxidante em comparação com as frações obtidas usando outros solventes;

✓ O tratamento com EB apresentou efeitos preventivos frente as alterações macroscópicas e histológicas no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol, como indicado pela redução do índice de úlcera e da preservação da estrutura celular do epitélio gástrico;

✓ O tratamento com o veículo NADES, EB ou suas frações preveniram o estresse oxidativo no modelo de úlcera gástrica induzido por etanol;

✓ O tratamento com EB ou sua fração rica em antocianinas restaurou parcialmente a atividade das enzimas antioxidantes e preveniu a infiltração de neutrófilos no modelo de úlcera gástrica induzida por etanol;

✓ O tratamento com a fração rica em antocianinas aumentou a produção dos ácidos graxos de cadeia curta, indicando um possível efeito das antocianinas no metabolismo da microbiota intestinal.

✓

## 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-SALAM, O. M. E. et al. Gastric mucosal integrity: Gastric mucosal blood flow and microcirculation. An overview. **Journal of Physiology Paris**, v. 95, n. 1–6, p. 105–127, 2001.
- ABDULLAH, N.; CHIN, N. L. Simplex-centroid mixture formulation for optimized composting of kitchen waste. **Bioresource Technology**, v. 101, n. 21, p. 8205–8210, 2010.
- ADINORTEY, M. B. et al. *In Vivo* Models Used for Evaluation of Potential Antigastrroduodenal Ulcer Agents. **Ulcers**, v. 2013, p. 1–12, 2013.
- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1984.
- AL BATRAN, R. et al. In Vivo Antioxidant and Antiulcer Activity of *Parkia speciosa* Ethanolic Leaf Extract against Ethanol-Induced Gastric Ulcer in Rats. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, p. 2–12, 2013.
- ALMASAUDI, S. B. et al. Antioxidant, anti-inflammatory, and antiulcer potential of manuka honey against gastric ulcer in rats. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.
- AL-QURAI SHY, S. et al. Olive (*Olea europaea*) leaf methanolic extract prevents HCl/ethanol-induced gastritis in rats by attenuating inflammation and augmenting antioxidant enzyme activities. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, p. 338–349, 2017.
- AMARAL, G. P. et al. Protective action of ethanolic extract of *Rosmarinus officinalis* L. in gastric ulcer prevention induced by ethanol in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 55, p. 48–55, 2013.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official methods of analysis. 18. ed. Arlington: Ed. 16, 2005.
- ARAB, H. H. et al. Diosmin protects against ethanol-induced gastric injury in rats: Novel anti-ulcer actions. **PLoS ONE**, v. 10, n. 3, p. 1–21, 2015.
- ARO, P. et al. Peptic ulcer disease in a general adult population: The kalixanda study: A random population-based study. **American Journal of Epidemiology**, v. 163, n. 11, p. 1025–1034, 2006.
- ARORA, T.; SHARMA, R.; FROST, G. Propionate. Anti-obesity and satiety enhancing factor? **Appetite**, v. 56, n. 2, p. 511–515, 2011.
- ATUMA, C. et al. The adherent gastrointestinal mucus gel layer: thickness and physical state in vivo. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 280, n. 5, p. G922–G929, 2001.
- AWAAD, A. S.; EL-MELIGY, R. M.; SOLIMAN, G. A. Natural products in treatment of ulcerative colitis and peptic ulcer. **Journal of Saudi Chemical Society**, p. 101–124, 2013.

- BADIOLA, N. et al. The Proton-Pump Inhibitor Lansoprazole Enhances Amyloid Beta Production. **PLoS ONE**, v. 8, n. 3, p. 1–8, 2013.
- BAE, M. et al. Protective effect of Korean red ginseng extract against *Helicobacter pylori*-induced gastric inflammation in Mongolian gerbils. **Journal of Ginseng Research**, v. 38, n. 1, p. 8–15, 2014.
- BAILEY, S. M. A review of the role of reactive oxygen and nitrogen species in alcohol-induced mitochondrial energy metabolism. **Free Radical Research**, v. 37, p. 585-596, 2003.
- BAILEY, S. M.; PIETSCH, E. C.; CUNNINGHAM, C. C. Ethanol stimulates the production of reactive oxygen species at mitochondrial complexes I and III. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 891-900, 1999.
- BALOGUN, S. O.; DAMAZO, A. S.; DE OLIVEIRA MARTINS, D. T. Helicteres sacarolha A. St.- Hil. et al.: Gastroprotective and possible mechanism of actions in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 166, p. 176–184, 2015.
- BANCROFT, J. D.; STEVENS, A. Theory and Practice of histological techniques. **The Journal of the American Medical Association**, v. 238, p. 2730–2730, 1977.
- BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.
- BEN BARKA, Z. et al. Protective effects of edible *Rhus tripartita* (Ucria) stem extract against ethanol-induced gastric ulcer in rats. **Journal of Functional Foods**, v. 30, p. 260–269, 2017.
- BENZIE, I. F.; STRAIN, J. J. Ferric reducing/antioxidant power assay: direct measure of total antioxidant activity of biological fluids and modified version for simultaneous measurement of total antioxidant power and ascorbic acid concentration. **Methods Enzymology**, v. 299, p. 15-27, 1999.
- BERENBAUM, F. Proinflammatory cytokines, prostaglandins, and the chondrocyte: mechanisms of intracellular activation,. **Bone Spine**, v. 67, p. 561 – 564, 2000.
- BHATTACHARYYA, A. et al. Oxidative Stress: An Essential Factor in the Pathogenesis of Gastrointestinal Mucosal Diseases. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 329–354, 2014.
- BI, W.; TIAN, M.; ROW, K. H. Evaluation of alcohol-based deep eutectic solvent in extraction and determination of flavonoids with response surface methodology optimization. **Journal of Chromatography A**, v. 1285, p. 22–30, 2013.
- BIAN, Y. et al. Patterns of simple sequence repeats in cultivated blueberries (*Vaccinium* section *Cyanococcus* spp.) and their use in revealing genetic diversity and population structure. **Molecular Breeding**, p. 675–689, 2014.
- BIRBEN, E. et al. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **WAO Journal**, v. 5, p. 9–19, 2012.

BLIGH, E. G.; DIER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, p. 911–917, 1959.

BOCHI, V. C. et al. Polyphenol extraction optimisation from Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) pulp. **Food Chemistry**, v. 164, p. 347–354, 2014.

BOCHI, V. C.; GODOY, H. T.; GIUSTI, M. M. Anthocyanin and other phenolic compounds in Ceylon gooseberry (*Dovyalis hebecarpa*) fruits. **Food chemistry**, v. 176, p. 234–43, 2015.

BOLIGON, A. A. et al. Antiulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. **Acta Pharmaceutica Sinica B**, v. 4, n. 5, p. 358–367, 2014.

BORGES, G. et al. Identification of flavonoid and phenolic antioxidants in black currants, blueberries, raspberries, red currants, and cranberries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, n. 7, p. 3901–3909, 2010.

BOSILJKOV, T.; DUJMI, F. Food and Bioproducts Processing Natural deep eutectic solvents and ultrasound-assisted extraction : Green approaches for extraction of wine lees anthocyanins. **Food and Bioproducts Processing**, v. 2, p. 195–203, 2016.

BRENNER, H.; BERG, G.; LAPPUS, N.; KLIEBSCH, U.; BODE, G.; BOEING, H. Alcohol consumption and *Helicobacter pylori* infection: results from the German National Health and Nutrition Survey. **Epidemiology**, v. 10, n. 3, p. 214–218, 1999.

BROOKS, R.M; OLMO, H. . **Register of fruit and nut varieties**. ed 3. Alexandria: ASHS Press, 1997.

BRUZZI, P. Non-drug industry funded research. **Bmj**, v. 336, n. 7634, p. 1–2, 2008.

BRZOZOWSKI, T. et al. “Involvement of endogenous cholecystokinin and somatostatin in gastroprotection induced by intraduodenal fat”. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 27(1), p. 125–137, 1998.

CARDONA, F. et al. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 24, p. 1415–1422, 2013.

CARLBERG, I.; MANNER, B. Inhibition of glutathione reductase by interaction of 2,4,6-trinitrobenzenesulfonate with the active-site dithiol. **FEBS Letters**, v. 98, n. 2, p. 263–266, 1979.

CARRASCO-POZO, C. et al. Molecular mechanisms of gastrointestinal protection by quercetin against indomethacin-induced damage: Role of NF- $\kappa$ B and Nrf2. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 27, p. 289–298, 2016.

CASTAÑEDA-OVANDO, A. et al. Chemical studies of anthocyanins: A review. **Food Chemistry**, v. 113, n. 4, p. 859–871, 2009.

CEMEK, M.; YILMAZ, E.; BÜYÜKOKUROĞLU, M. E. Protective effect of *Matricaria chamomilla* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 48, n. 7, p. 757–763, 2010.

CHOI, E.-Y.; HWANG, H.-J.; NAM, T.-J. Protective effect of a polysaccharide from *Hizikia fusiformis* against ethanol-induced cytotoxicity in IEC-6 cells. **Toxicology in vitro : an international journal published in association with BIBRA**, v. 24, n. 1, p. 79–84, 2010.

CHORFA, N.; SAVARD, S.; BELKACEMI, K. An efficient method for high-purity anthocyanin isomers isolation from wild blueberries and their radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v. 197, p. 1226–1234, 2016.

CHUNG, K. T.; SHELAT, V. G. Perforated peptic ulcer - an update. **World Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 9, n. 1, p. 1, 2017.

CLIFFORD, M. N.; SCALBERT, A. Review Ellagitannins – nature , occurrence and dietary burden. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 1999, p. 1118–1125, 2000.

COLANTUONI, A., BERTUGLIA, S.; MAGISTRETTI, M.-J., D. L. Effects of *Vaccinium Myrtillus* anthocyanosides on arterial vasomotion. **Arzneimittel-forschung**, v. 9, p. 905–909, 1991.

COMMITTEE, S.; SCCP, C. P. Scientific Committee on Consumer Products Citric acid (and Silver citrate). **Health and Consumer Protection**, n. January, 2009.

CORREA-BETANZO, J. et al. Stability and biological activity of wild blueberry (*Vaccinium angustifolium*) polyphenols during simulated in vitro gastrointestinal digestion. **Food Chemistry**, v. 165, p. 522–531, 2014.

CVJETKO BUBALO, M. et al. Green extraction of grape skin phenolics by using deep eutectic solvents. **Food Chemistry**, v. 200, p. 159–166, 2016.

CVJETKO BUBALO, M. et al. Green solvents for green technologies. **Journal of Chemical Technology and Biotechnology**, v. 90, n. 9, p. 1631–1639, 2015.

DAI, Y. et al. Application of natural deep eutectic solvents to the extraction of stability replacing conventional organic solvents. **Journal of Chromatography A**, v. 1434, p. 50–56, 2016.

DAI, Y.; SPRONSEN, J. VAN; WITKAMP, G. Analytica Chimica Acta Natural deep eutectic solvents as new potential media for green technology. **Analytica Chimica Acta**, v. 766, p. 61–68, 2013.

DANGELO J. G.; FATTINI. C. A. **Anatômica humana sistêmica e segmentar**. ed 3. São Paulo: Atheneu, 2007.

DRINI, M. Peptic ulcer disease and non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Australian Prescriber**, v. 40, n. 3, p. 91–93, 2017.

DUDONNÉ, S. et al. Potentiation of the bioavailability of blueberry phenolic compounds by co-ingested grape phenolic compounds in mice, revealed by targeted metabolomic profiling in plasma and feces. **Food and Function**, v. 7, n. 8, 2016.

EDIRISINGHE, I.; BURTON-FREEMAN, B. Anti-diabetic actions of Berry polyphenols – Review on proposed mechanisms of action. **Journal of Berry Research**, v. 6, p. 237–250, 2016.

EISIG, J. N.; LAUDANNA, A. A. Úlcera péptica. **Programa de saúde da família**, Urlândia, 2001.

ESPINO, M. et al. Natural designer solvents for greening analytical chemistry. **TrAC - Trends in Analytical Chemistry**, v. 76, p. 126–136, 2016.

FAGGIAN, M. et al. Natural Deep Eutectic Solvents ( NADES ) as a Tool for Bioavailability Improvement : Pharmacokinetics of Rutin Dissolved in Proline / Glycine after Oral Administration in Rats : Possible Application in Nutraceuticals. **Molecules**, p. 1–11, 2016.

FEDERAÇÃO BRASILEIRA DE GASTROENTEROLOGIA (FBG), 2015. Disponível em : <http://www.fbg.org.br/>. Acesso em 03 de fev. 2018.

FERREIRA, L. F. **Otimização da extração aquosa de polifenóis do bagaço de mirtilo e do resíduo da vinificação**. 2017. 132p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos)-Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, 2017.

FESHARAKI, M. et al. Reactive oxygen metabolites and anti-oxidative defenses in aspirin-induced gastric damage in rats: gastroprotection by Vitamin E. **Pathophysiology**, v. 13, n. 4, p. 237–243, 2006.

FRANKE, A.; TEYSSEN, S.; SINGER, M. V. Alcohol-related diseases of the esophagus and stomach. **Digestive Diseases**, v. 23, n. 3–4, p. 204–213, 2006.

FREEDBERG, D. E.; KIM, L. S.; YANG, Y. X. The Risks and Benefits of Long-term Use of Proton Pump Inhibitors: Expert Review and Best Practice Advice From the American Gastroenterological Association. **Gastroenterology**, v. 152, n. 4, p. 706–715, 2017.

GANGULY, A. K. “A method for quantitative assessment of experimentally produced ulcers in the stomach of albino rats. **Experientia**, v. 25, p. 1224, 1969.

GARTNER, L. P., HIATT, J. L. **Tratado de Histologia em Cores**. 2 ed. Rio de Janeiro: Ed 2ª, 2003.

GRAHAM, D. Y. History of Helicobacter pylori, duodenal ulcer, gastric ulcer and gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 18, p. 5191–5204, 2014.

GRISHAM, M. B.; HERNANDEZ, L.; GRANGER, D. N. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia. **The American Journal of Physiology**, v. 251(4 Pt 1), p. G567–G574, 1986.

GROMOVAYA, V. F.; SHAPOVAL, G. S.; MIRONYUK, I. E. Antiradical and Antioxidant Activity of Biologically Active Carboxylic Acids. **Russian Journal of General Chemistry**, v. 72, n. 5, p. 774–775, 2002.

GU, L. et al. Fractionation of polymeric procyanidins from lowbush blueberry and

quantification of procyanidins in selected foods with an optimized normal-phase HPLC-MS fluorescent detection method. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, n. 17, p. 4852–4860, 2002.

GU, T. et al. Deep eutectic solvents as novel extraction media for phenolic compounds from model oil. **Chem. Commun.**, v. 50, n. 79, p. 11749–11752, 2014.

GUERRANT, N.B., WHITLOCK, G.P., WOLFF, M.L. & DUTCHER, R. . Responses of rats to diets containing varying amounts of glycerol and propylene glycol. **Bulletin. National Formulary Committee American Pharmaceutical Association**, v. 15, p. 205–229, 1947.

HABEEB, A., et al. Peptic Ulcer Disease: Descriptive Epidemiology, Risk Factors, Management and Prevention. **Peptic Ulcer Disease**, p. 1–13, 2016.

HABIG, W.H.; PABST, M.J; JAKOBY, W. B. Glutathione S-Transferases. The First Enzymatic Step in Mercapturic Acid Formation. **Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130–7139, 1974.

HAGHAZALI M. et al. Proinflammatory cytokines and thrombomodulin in patients with peptic ulcer disease and gastric cancer, infected with *Helicobacter pylori*. **Indian Journal of Pathology & Microbiology**, v. 54, p. 103–106, 2011.

HALL, M. B. **Neutral detergent-soluble carbohydrates Nutritional relevance and Analysis**. A laboratory Manual. Bolletin 339. University of Florida Extension Institute of Food and Agricultural Sciences. 2000.

HALLIWELL, B. Free Radicals and Other Reactive Species in Disease. **eLS**, p. 1–9, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. Free Radicals in Biology and Medicine. **Oxford University Press**, v. 1, n. 4, p. 331–332, 1999.

HANASAND, M. et al. Improved detection of advanced oxidation protein products in plasma. **Clinica Chimica Acta**, v. 413, n. 9–10, p. 901–906, 2012.

HAYYAN, M. et al. Are deep eutectic solvents benign or toxic? **Chemosphere**, v. 90, n. 7, p. 2193–2195, 2013.

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 1, n. 1, p. 163–187, 2010.

HIDALGO, G.-I.; ALMAJANO, M. Red Fruits: Extraction of Antioxidants, Phenolic Content, and Radical Scavenging Determination: A Review. **Antioxidants**, v. 6, n. 1, p. 7, 2017.

HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 8, p. 206–212, 2006.

HISSIN, P. J.; HILF, R. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. **Analytical Biochemistry**, v. 74, n. 1, p. 214–26, 1976.



HOPKINS, J. Peptic Ulcer Disease. **Hopkins Medicine**, p. 1–17, 2013.

HORBOWICZ, M. et al. Anthocyanins of fruits and vegetables-their occurrence, analysis and role in human nutrition. **VegeTable Crops Research Bulletin**, v. 68, n. 1, p. 5-22, 2008.

HOSSEINI, E. et al. Propionate as a health-promoting microbial metabolite in the human gut. **Nutrition Reviews**, v. 69, n. 5, p. 245–258, 2011.

HUANG, W. et al. Effect of blueberry anthocyanins malvidin and glycosides on the antioxidant properties in endothelial cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

HUNTER, C. J.; DE PLAEN, I. G. Inflammatory signaling in NEC: role of NF-kappaB, cytokines and other inflammatory mediators. **Pathophysiology**, v. 21, n. 1, p. 55–65, 2014.

HUSVÉTH, F. **Physiological and reproductional aspects of animal production**. p. 2011, 2011.

induced gastric mucosa injury. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 38, p. 5857-INEU, R. P. et al. Antioxidant effect of zinc chloride against ethanol-induced gastrointestinal lesions in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 58, p. 522–529, 2013.

ISMAIL, I. F. et al. Gastroprotective activity of Polygonum chinense aqueous leaf extract on ethanol-induced hemorrhagic mucosal lesions in rats. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 9, 2012.

JAARIN, K. et al. Effect of palm vitamin E on the healing of ethanol-induced gastric injury in rats. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 51, p. S31–S41, 2000.

JABRI, M. A. et al. No Fatty acids composition and mechanism of protective effects of myrtle berries seeds aqueous extract against alcohol-induced peptic ulcer in rat. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, p. 1–43, 2016.

JAIN, K. S. et al. Recent advances in proton pump inhibitors and management of acid-peptic disorders. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 3, p. 1181–1205, 2007.

JEONG, K. M. et al. Highly efficient extraction of anthocyanins from grape skin using deep eutectic solvents as green and tunable media. **Archives of Pharmacal Research**, v. 38, n.12, p. 2143–2152, 2015.

JURGOŃSKI, A.; JUŚKIEWICZ, J.; ZDUŃCZYK, Z. An anthocyanin-rich extract from Kamchatka honeysuckle increases enzymatic activity within the gut and ameliorates abnormal lipid and glucose metabolism in rats. **Nutrition**, v. 29, n. 6, p. 898-902, 2013.

KAHRAMAN, A. et al. The antioxidative and antihistaminic properties of quercetin in ethanol-induced gastric lesions. **Toxicology**, v. 183, n. 1–3, p. 133–142, 2003.

KALIA, K. et al. Effects of extraction methods on phenolic contents and antioxidant activity in aerial parts of *Potentilla atrosanguinea* Lod.. and quantification of its phenolic constituents by RP-HPLC. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 10129–10134, 2008.

KAMILOGLU, S. et al. Anthocyanin absorption and metabolism by human intestinal Caco-2 cells—A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 9, p. 21555–21574, 2015.

KANG, J.-W. et al. Protective Effect of *Flos Lonicerae* against Experimental Gastric Ulcers in Rats: Mechanisms of Antioxidant and Anti-Inflammatory Action. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

KAULMANN, A.; BOHN, T. Bioactivity of Polyphenols: Preventive and Adjuvant Strategies toward Reducing Inflammatory Bowel Diseases - Promises, Perspectives, and Pitfalls. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

KEMMERLY, T.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 29, n. 6, p. 642–649, 2013.

KHALEEL, S. A. et al. Lansoprazole halts contrast induced nephropathy through activation of Nrf2 pathway in rats. **Chemico-Biological Interactions**, v. 270, p. 33–40, 2017.

KIM, S. J. et al. Anthocyanins accelerate the healing of naproxen-induced gastric ulcer in rats by activating antioxidant enzymes via modulation of Nrf2. **Journal of Functional Foods**, v. 7, n. 1, p. 569–579, 2014.

KOBAYASHI, M.; YAMAMOTO, M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. **Advances in Enzyme Regulation**, v. 46, n. 1, p. 113–140, 2006.

KONDA, P. P. B. **Compostos fenólicos e capacidade antioxidante em espécies de mirtilo produzidas no Brasil**. 2014. xv, 146f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2014.

KONG, J. M. et al. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, n. 5, p. 923–933, 2003.

KONTUREK, P. C.; KONTUREK, S. J.; OCHMAŃSKI, W. Neuroendocrinology of gastric H<sup>+</sup> and duodenal HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> secretion: The role of brain-gut axis. **European Journal of Pharmacology**, v. 499, n. 1–2, p. 15–27, 2004.

KUMAR, H. et al. Natural product-derived pharmacological modulators of Nrf2/ARE pathway for chronic diseases. **Natural Product Reports**, v. 31, n. 1, p. 109–139, 2014.

LAFAY, S. et al. Chlorogenic acid is absorbed in its intact form in the stomach of rats. **The Journal of nutrition**, v. 136, n. 5, p. 1192–1197, 2006.

LAINE, L.; TAKEUCHI, K.; TARNAWSKI, A. Gastric Mucosal Defense and Cytoprotection: Bench to Bedside. **Gastroenterology**, v. 135, p. 41–60, 2008.

LANAS, A. Role of nitric oxide in the gastrointestinal tract. **Arthritis Research & Therapy**, v. 10, n. 2, p. S4, 2008.

LAURENCE, L. et al. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman & Gilman**.

2. ed. Porto Alegre: AMGH, 2012.

LAURET, M. E. et al. Peptic Ulcer Disease. **Austin Journal of Gastroenterology**, v. 2, n. 5, p. 1055, 2015.

LEE, H. C. et al. Effect of tea phenolics and their aromatic fecal bacterial metabolites on intestinal microbiota. **Research in Microbiology**, v. 157, n. 9, p. 876–884, 2006.

LEE, H. J. et al. A possible involvement of Nrf2-mediated heme oxygenase-1 up-regulation in protective effect of the proton pump inhibitor pantoprazole against indomethacin-induced gastric damage in rats. **BMC Gastroenterology**, v. 12, n. 1, p. 1, 2012.

LEE, J. H. et al. Dietary phytochemicals and cancer prevention: Nrf2 signaling, epigenetics, and cell death mechanisms in blocking cancer initiation and progression. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 137, n. 2, p. 153–171, 2013.

LEE, J.-M.; JOHNSON, J. A; ELEMENT, A. R. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. **Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, v. 37, n. 2, p. 139–143, 2004.

LIANG, J. et al. Protective effect of patchoulene epoxide against ethanol-induced gastric ulcer in rats: Influence on oxidative stress, inflammation and apoptosis. **Chemico-Biological Interactions**, v. 283, p. 30-37, 2018.

LIU, J. et al. Short Chain Fatty Acid Acetate Protects against Ethanol-Induced Acute Gastric Mucosal Lesion in Mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 40, n. 9, p. 1439–1446, 2017.

LIU, Y. H. et al. Gastroprotective effect of andrographolide sodium bisulfite against indomethacin-induced gastric ulceration in rats. **International Immunopharmacology**, v. 26, n. 2, p. 384–391, 2015.

LOPES, R. M. et al. Flavonóides. **Biotecnologia, Ciência & Desenvolvimento**, v. 3, n. 14, p. 18–22, 2000.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the Folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, n. 1, p. 265-275, 1951.

LUO, C. et al. Protective effect of coptisine free base on indomethacin-induced gastric ulcers in rats: Characterization of potential molecular mechanisms. **Life Sciences**, v. 193, p. 47–56, 2018.

MALFERTHEINER, P.; CHAN, F. K.; MCCOLL, K. EL. Peptic ulcer disease. **The Lancet**, v. 374, n. 9699, p. 1449–1461, 2009.

MANZO-AVALOS, S.; SAAVEDRA-MOLINA, A. Cellular and Mitochondrial Effects of Alcohol Consumption. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 7, p. 4281-4304, 2010.

MARÍN, L. et al. Bioavailability of dietary polyphenols and gut microbiota metabolism:

Antimicrobial properties. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

MASELLA, R. et al. Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: Involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 16, n. 10, p. 577–586, 2005.

MASSIGNANI, J. J. et al. Antiulcerogenic Activity of the Essential Oil of *Baccharis dracunculifolia* on Different Experimental Models in Rats. **Phytotherapy Research**, v. 23, p. 1355–1360, 2009.

MCDOUGALL, G. J. et al. Different polyphenolic components of soft fruits inhibit  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glycosidase. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 7, p. 2760–2766, 2005.

MCGHIE, T. K.; WALTON, M. C. The bioavailability and absorption of anthocyanins: Towards a better understanding. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, n. 6, p. 702–713, 2007.

MCLOUGHLIN, R.F. et al. Short-chain fatty acids, prebiotics, synbiotics, and systemic inflammation: a systematic review and meta-analysis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106, n. 3, p. 930–945, 2017.

MICHALSKA, A.; ŁYSIAK, G. Bioactive compounds of blueberries: Post-harvest factors influencing the nutritional value of products. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 8, p. 18642–18663, 2015.

MIRANDA, K. M.; ESPEY, M. G.; WINK, D. A. A Rapid, Simple Spectrophotometric Method for Simultaneous Detection of Nitrate and Nitrite. **Nitric Oxide**, v. 5, n. 1, p. 62–71, 2001.

MOCO, S.; MARTIN, F. P. J.; REZZI, S. Metabolomics view on gut microbiome modulation by polyphenol-rich foods. **Journal of Proteome Research**, v. 11, n. 10, p. 4781–4790, 2012.

MONCADA S, H. A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 2002–2012, 1993.

MORAES, J. O. DE et al. Study of rabbiteye blueberry ( *Vaccinium ashei* Reade ) in the process of food products. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 18–22, 2007.

MORAIS, P. DE; GONC, F. Ecotoxicity of Cholinium-Based Deep Eutectic Solvents. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, n. 12, p. 3398–3404, 2015.

MORRISON, D. J.; PRESTON, T. Formation of short chain fatty acids by the gut microbiota and their impact on human metabolism. **Gut Microbes**, v. 7, n. 3, p. 189–200, 2016.

MÜLLER, D.; SCHANTZ, M.; RICHLING, E. High Performance Liquid Chromatography Analysis of Anthocyanins in Bilberries (*Vaccinium myrtillus* L.), Blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.), and Corresponding Juices. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 4, p. 1–6, 2012.

NAGULSAMY, P.; PONNUSAMY, R.; THANGARAJ, P. Evaluation of antioxidant, anti-inflammatory, and antiulcer properties of *Vaccinium leschenaultii* Wight: A therapeutic supplement. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 23, n. 3, p. 376–386, 2015.

NISHIDA, K.; OHTA, Y.; ISHIGURO, I. Contribution of NO synthases to neutrophil infiltration in the gastric mucosal lesions in rats with water immersion restraint stress. **FEBS letters**, v. 425, n. 2, p. 243–8, 1998.

OGAWA, K. et al. The protective effect and action mechanism of *vaccinium myrtillus* L. on gastric ulcer in mice. **Phytotherapy Research**, v. 25, n. 8, p. 1160–1165, 2011.

OKTAVIYANTI, I. K.; THALIB, I.; SUHARTONO, E. The Protective Efficacy of Quercetin on Mefenamic Acid-Induced Gastric Mucosal Damage. **International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 8, n. 10, p. 1390–1395, 2016.

OLIVEIRA, T. P. DE; PANTE, G. C.; SEREIA, M. J. Caracterização e aplicação da polpa de mirtilo (*Vaccinium* sp.) in natura e em pó em frozen yogurt. **Brazilian Journal of Food Research**, v. 6, n. 3, p. 23 – 31, 2015.

OU, B.; HAMPSCH-WOODALL, M.; PRIOR, R. L. Development and Validation of an Improved Oxygen Radical Absorbance Capacity Assay Using Fluorescein as the Fluorescent Probe. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4619-4626, 2001.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). Portal do Ministério da Saúde. 2014. Disponível em: [http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/v4n9\\_erradicacao\\_hpylori.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/v4n9_erradicacao_hpylori.pdf). Acesso em 04 de jan. 2018.

OZDAL, T. et al. The reciprocal interactions between polyphenols and gut microbiota and effects on bioaccessibility. **Nutrients**, v. 8, n. 2, p. 1–36, 2016.

PAGLIA, D. E.; VALENTINE, W. N. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. **Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 70, p. 158–169, 1967.

PAIVA, A. et al. Natural Deep Eutectic Solvents – Solvents for the 21st Century. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 2, n. 5, p. 1063–1071, 2014.

PAN, J. S. et al. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 38, p. 5857-5867, 2008.

PARKAR, S. G.; TROWER, T. M.; STEVENSON, D. E. Fecal microbial metabolism of polyphenols and its effects on human gut microbiota. **Anaerobe**, v. 23, p. 12–19, 2013.

PAYNE, T. J. Formulating with Blueberries for Health. **Cereal Foods World**, v. 50, n. 5, p. 262-264, 2005.

PÉREZ, S. et al. Author's Accepted Manuscript Redox Signaling In The Gastrointestinal Tract. **Free Radical Biology and Medicine**, 2016.

- PERTUZATTI, A, P. B. et al. Quantification of Several Bioactive Compounds and Antioxidant Activities of Six Cultivars of Brazilian Blueberry. **The Natural Products Journal**, v. 2, p. 188-195, 2012.
- PERTUZATTI, P. B. Compostos bioativos em diferentes cultivares de mirtilo (*Vaccinium ashei* Reade). 2009. 69p. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, 2009. Disponível em: [http://dcta.create.inf.br/manager/uploads/documentos/dissertacoes/MEST\\_PAULA\\_BECKER\\_PERTUZATTI.pdf](http://dcta.create.inf.br/manager/uploads/documentos/dissertacoes/MEST_PAULA_BECKER_PERTUZATTI.pdf). Acesso em 05 de jan. 2018.
- PERTUZATTI, P. B. et al. Antimicrobial activity and differentiation of anthocyanin profiles of rabbiteye and highbush blueberries using HPLC–DAD–ESI–MSn and multivariate analysis. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 506–516, 2016.
- PETERSSON, J. et al. Dietary nitrate increases gastric mucosal blood flow and mucosal defense. **AJP: Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 292, n. 3, p. G718–G724, 2006.
- PHILLIPSON, M. Acid Transport through Gastric Mucus. **Upsala Journal of Medical Sciences**, v. 109, p. 1–25, 2004.
- POJER, E. et al. The Case for Anthocyanin Consumption to Promote Human Health: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 5, p. 483–508, 2013.
- POMMIER, B. et al. Further evidence that the CCK2 receptor is coupled to two transduction pathways using site-directed mutagenesis. **Journal of Neurochemistry**, v. 85, p. 454–461, 2003.
- POURRAJAB, F. et al. Cross talk of the first-line defense TLRs with PI3K/Akt pathway, in preconditioning therapeutic approach. **Molecular and Cellular Therapies**, v. 3, n. 1, p. 4, 2015.
- PRIOR, R. L. et al. Antioxidant Capacity As Influenced by Total Phenolic and Anthocyanin Content, Maturity, and Variety of *Vaccinium* Species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 8561, n. 98, p. 2686–2693, 1998.
- RADOŠEVIĆ, K. et al. Natural deep eutectic solvents as beneficial extractants for enhancement of plant extracts bioactivity. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 45–51, 2016.
- RASEIRA, M. DO C. B.; ANTUNES, L. E. C. **A cultura do mirtilo**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2004. 69 p. (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 121). Disponível em: <https://www.embrapa.br/clima-temperado/busca-de-publicacoes/-/publicacao/744895/a-cultura-do-mirtilo>. Acesso em 02 de dez. 2017.
- REIN, M. J. **Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins**. 2015 Dissertação (Mestrado em Agricultura e Pescas)-University of Helsinki, Helsinki, 2005. 87p. Disponível em: <https://pdfs.semanticscholar.org/39b5/0e7a118ade7e5553f50e243443b18f6aa728.pdf>. Acesso

em 15 de dez. 2017.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

ROBERT, A. Cytoprotection by Prostaglandins. **Gastroenterology**, v. 77, p. 761–767, 1979.

RODRÍGUEZ-MATEOS, A. et al. Procyanidin , anthocyanin and chlorogenic acid content of highbush and lowbush blueberries Running Title : Flavonoid content of blueberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry (ACS Publications)**, v. 60, n. 23, p. 5772-5778, 2011.

RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; WROLSTAD, R. E. Extraction , Isolation , and Purification of. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, p. F1.1.1, 2001.

ROTHENBACHER, D.; BRENNER, H. Burden of Helicobacter pylori and H. pylori-related diseases in developed countries: Recent developments and future implications. **Microbes and Infection**, v. 5, n. 8, p. 693–703, 2003.

RUSSELL, R. I. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and gastrointestinal damage - Problems and solutions. **Postgraduate Medical Journal**, v. 77, n. 904, p. 82–88, 2001.

SAID, H.; KAJI, I.; KAUNITZ, J. D. Gastroduodenal mucosal defense mechanisms. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 31, n. 6, p. 486–491, 2015.

SCHAFER, F. Q.; BUETTNER, G. R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 30, n. 11, p. 1191–1212, 2001.

SCHEFFÉ, H. The simplex-centroid design for experiments with mixtures. **Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)**, v. 25, p. 235–263, 1963.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 20, p. 519–525, 2004.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 21, p. 636–643, 2005.

SCHUBERT, M. L. Gastric secretion. **Gastroenterology**, v. 26, p. 598–603, 2010.

SCHUBERT, M. L. Regulation of gastric acid secretion. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 15, n. 6, p. 457–462, 1999.

SCHUBERT, M. L.; PEURA, D. A. Control of Gastric Acid Secretion in Health and Disease. **Gastroenterology**, v. 134, n. 7, p. 1842–1860, 2008.

SHAKER, E.; MAHMOUD, H.; MNAA, S. Anti-inflammatory and anti-ulcer activity of the extract from Alhagi maurorum (camelthorn). **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 10, p. 2785–2790, 2010.

SHI, M. et al. Blueberry as a source of bioactive compounds for the treatment of obesity, type 2 diabetes and chronic inflammation. **Journal of Functional Foods**, v. 30, p. 16–29, 2017.

SHIVAPURKAR, N.; HOOVER, K. L.; POIRER, L. A. Effect of methionine and choline on liver tumor promotion by phenobarbital and DDT in diethylnitrosamine-initiated rats. **Carcinogenesis**, v. 7, p. 547–550, 1986.

SINGH, A. et al. Dysfunctional KEAP1-NRF2 interaction in non-small-cell lung cancer. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 10, p. 1865–1876, 2006.

SPANOGIANNOPOULOS, P. et al. The microbial pharmacists within us: A metagenomic view of xenobiotic metabolism. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 5, p. 273–287, 2016.

SPITZ, D. R.; OBERLEY, L. W. An assay for superoxide dismutase activity in mammalian tissue homogenates. **Analytical Biochemistry**, v. 179, n. 1, p. 8–18, 1989.

STEVENSON, D.; SCALZO, J. Anthocyanin composition and content of blueberries from around the world. **Journal of Berry Research**, v. 2, n. 4, p. 179–189, 2012.

STOHS, S. J.; BAGCHI, D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 18, n. 2, p. 321–336, 1995.

SUN, D. W. Extracting bioactive compounds for food products: theory and applications. **CRC Press**, Boca Raton, p. 2-4, 2008.

SUN, M. et al. Microbiota metabolite short chain fatty acids, GPCR, and inflammatory bowel diseases. **Journal of Gastroenterology**, v. 52, p. 1-8, 2017.

SUT, S. et al. Natural Deep Eutectic Solvents (NADES) to enhance berberine absorption: An in vivo pharmacokinetic study. **Molecules**, v. 22, n. 11, p. 1–11, 2017.

TAGLIAZUCCHI, D. et al. In vitro bio-accessibility and antioxidant activity of grape polyphenols. **Food Chemistry**, v. 120, n. 2, p. 599–606, 2010.

TALAVÉRA, S. et al. Bioavailability of a bilberry anthocyanin extract and its impact on plasma antioxidant capacity in rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 1, p. 90–97, 2006.

TAMURA, M.; MATSUI, H.; KANEKO, T.; HYODO, I. Alcohol is an oxidative stressor for gastric epithelial cells: detection of superoxide in living cells. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 53, n. 2, p. 75–80, 2013.

TATEMACHI, M. et al. Roles of inducible nitric oxide synthase in the development and healing of experimentally induced gastric ulcers. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 84, n. 5, p. 213–220, 2003.

THABREW, M.; ARAWWAWALA, L. An Overview of In Vivo and In Vitro Models that can be used for Evaluating Anti-Gastric Ulcer Potential of Medicinal Plants. **Austin Biology**, v. 1, n. 2, p. 1007, 2016.



TUKOV, F. F. et al. The Role of Tumor Necrosis Factor Alpha in Lipopolysaccharide/Ranitidine-Induced. **Toxicological sciences : an official journal of the Society of Toxicology**, v. 100, n. 1, p. 267–80, 2007.

UPADHYAY, S.; DIXIT, M. Role of polyphenols and other phytochemicals on molecular signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, 2015.

VAN RYMENANT, E. et al. Chronic exposure to short chain fatty acids modulates intestinal transport metabolism of microbiome-derived phenolics, submitted. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 39, p. 156–168, 2017.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? **Physiological Reviews**, v. 88, n. 4, p. 1547–1565, 2008.

WALLACE, J. L.; MILLER, M. J. S. Nitric oxide in mucosal defense: A little goes a long way. **Gastroenterology**, v. 119, n. 2, p. 512–520, 2000.

WILLIAMS, C.; HYLAND, E. Proton Pump Inhibitors : Dangerous and Habit-Forming Heartburn Drugs. **Health Letter**, v. 27, n. 9, 2011.

WONG, J. M. et al. Colonic Health : Fermentation and Short Chain Fatty Acids. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 40, n. 3, p. 1–2, 2006.

YOUNES-IBRAHIM, M. Revisão / Atualização em Fisiologia e Fisiopatologia Renal : ATPases K-dependentes ao longo do néfron. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, v. 19, n. 1, p. 66–72, 1997.

YU, H. et al. Protective effect of anthocyanins extract from blueberry on TNBS-induced IBD model of mice. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2011, 2011.

YUAN, Y.; PADOL, I. T.; HUNT, R. H. Peptic ulcer disease today. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, n. 2, p. 80–89, 2006.

ZADERNOWSKI, R.; NACZK, M.; NESTEROWICZ, J. Phenolic acid profiles in some small berries. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 6, p. 2118–2124, 2005.

ZAFRA-STONE, S. et al. Berry anthocyanins as novel antioxidants in human health and disease prevention. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 51, n. 6, p. 675–683, 2007.

ZHAO, B. et al. Biocompatible Deep Eutectic Solvents Based on Choline Chloride: Characterization and Application to the Extraction of Rutin from *Sophora japonica*. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 3, n. 11, p. 2746–2755, 2015.

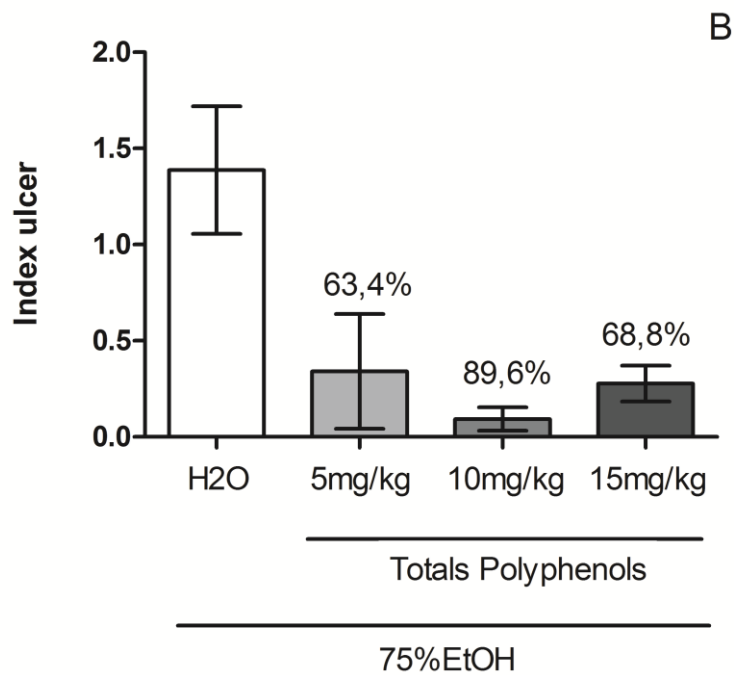
ZHAO, C. et al. Effects of Commercial Anthocyanin-Rich Extracts on Colonic Cancer and Nontumorigenic Colonic Cell Growth Effects of Commercial Anthocyanin-Rich Extracts on Colonic Cancer and Nontumorigenic Colonic Cell Growth. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 52, p. 6122–6128, 2004.

ZHAO, G.; NYMAN, M.; JÖNSSON, J. Å. Rapid determination of short-chain fatty acids in

colonic contents and faeces of humans and rats by acidified water-extraction and direct-injection gas chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, n.8, p. 674–682, 2006.

ZHENG, H. et al. Evaluation of protective effects of costunolide and dehydrocostuslactone on ethanol-induced gastric ulcer in mice based on multi-pathway regulation. **Chemico-Biological Interactions**, v. 250, p. 68–77, 2016.

**ANEXO A – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE MIRTILO NAS DOSES 5,10 E 15 mg/kg DE POLIFENÓIS TOTAIS NA APARÊNCIA MACROSCÓPICA DO ESTÔMAGO (A) E ÍNDICE DE ÚLCERA (B) (EXPERIMENTO PILOTO *IN VIVO*)**



**ANEXO B – EFEITO DO EXTRATO BRUTO DE MIRTILO NAS DOSES 5,10 E 15 mg/kg DE POLIFENÓIS TOTAIS NO SISTEMA ANTIOXIDANTE NÃO ENZIMÁTICO (A) E ENZIMÁTICO (B)**

