



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

# **Impacto da bioacessibilidade e biodisponibilidade dos compostos fenólicos das cerejas na atividade antioxidante**

(versão final após defesa)

**Joana Domingos Gonçalves**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Bioquímica**

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Professora Doutora Ana Paula Coelho Duarte

Co-orientador: Professora Doutora Maria Eugenia Gallardo Alba

**Covilhã, junho de 2018**



# Dedicatória

À estrela mais brilhante que me acompanha todos os dias

Ao meu avô



# Agradecimentos

À minha orientadora, Professora Doutora Ana Paula Duarte, por me ter aceite neste projeto, e por ter conduzido este desafio.

À minha coorientadora, Professora Doutora Eugenia Gallardo, por todo o apoio, amizade, disponibilidade, dedicação e experiência que foram fundamentais para o desenvolvimento do presente trabalho. Por ter sido das melhores docentes que tive ao longo do meu percurso académico.

Ao Mestre Tiago Rosado, por toda a amizade, ajuda prestada no desenvolvimento do trabalho e esclarecimento de dúvidas.

À Mestre Sandra Rocha, por toda a dedicação, paciência e ensinamentos transmitidos.

À Doutora Cátia Vaz pelos ensinamentos transmitidos.

À Emika e à Sofia que acompanharam de perto este desafio, mas também à Catarina, à Aysa, à Trifas e à PT que estiveram sempre lá.

Ao meu namorado, Paulo, por toda a paciência, apoio e preocupação ao longo dos anos.

À minha irmã, Mónica, por todos os telefonemas e desabaços e por todo o apoio que sempre me deu.

Por último, mas mais importante, aos meus pais, que tornaram tudo isto possível e sempre acreditaram em mim e nas minhas capacidades. Por todo o amor e ensinamentos que me tornaram no que sou hoje.

Obrigada.



## Resumo

O fruto de *Prunus avium L.*, vulgarmente conhecido como cereja, é uma excelente fonte de fitoquímicos, nomeadamente compostos fenólicos, que são metabolitos secundários das plantas e caracterizam-se por possuir pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo ligados. Estes compostos têm despertado o interesse dos consumidores nos últimos anos pelos inúmeros benefícios que apresentam para o organismo. A sua atividade antioxidante, bem como todos os processos desencadeados pela mesma estão na origem desses mesmos efeitos benéficos.

Assim, com este estudo pretendeu-se determinar *in vitro* o impacto da biodisponibilidade na bioatividade dos compostos fenólicos presentes nas cerejas. Para isso, recorreu-se a uma linha celular derivada do tumor gastrointestinal (Caco-2) como modelo para simular a absorção gastrointestinal, tendo-se primeiramente averiguado a permeabilidade e integridade da monocamada formada pela linha celular, e posteriormente avaliou-se a permeabilidade da mesma aos compostos fenólicos contidos num extrato de cereja da variedade *Saco* digerido *in vitro* e não digerido. Decorrida incubação procedeu-se à quantificação dos compostos fenólicos que permeabilizaram a membrana simulada recorrendo à técnica de HPLC-DAD. Paralelamente, foi avaliado o efeito da passagem pela barreira celular na atividade antioxidante dos extratos já referidos, tendo-se para isso usado o ensaio com 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH).

Os resultados obtidos demonstraram que os compostos fenólicos do fruto de *Prunus avium L.* após sofrerem um processo de digestão simulada, foram absorvidos pela barreira celular, tornando-se biodisponíveis. Porém, estes mesmos compostos apresentavam-se em concentrações diminuídas relativamente às iniciais. Contrariamente, quando o mesmo extrato de cereja não sujeito a digestão foi colocado em contacto com a mesma camada de células apenas a quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo conseguiu tornar-se biodisponível. Também a atividade antioxidante foi maior antes da passagem pela monocamada celular, sendo a percentagem de inibição de DPPH de 0% após esse mesmo processo. Ao contrário do que se verificou após a incubação com o extrato digerido *in vitro*, a integridade da monocamada celular ficou alterada e a permeabilidade da mesma aumentou aquando da incubação com o extrato bruto. Isto sugere que os compostos presentes no extrato bruto e que interferem com as junções intercelulares, após o processo digestivo, sofrem modificações, ficando mais bioacessíveis, uma vez que são degradados originando compostos mais pequenos. Foi possível verificar que a absorção ficou facilitada, aumentando a sua biodisponibilidade. Estes fatores mostraram-se relevantes para a integridade e permeabilidade celular.

Tendo em conta os resultados obtidos, este estudo sugere que a digestão é um processo indispensável para que ocorra absorção, pois sem ele o conteúdo fenólico da matriz alimentar não fica bioacessível. Também a função da barreira celular ficou comprometida aquando da incubação com o extrato não digerido.

É de realçar que o presente trabalho é apenas um ensaio *in vitro* e são necessárias investigações futuras de modo a corroborar os resultados apresentados. Assim, outros estudos *in vitro* e *in vivo* devem ser realizados.

## **Palavras-chave**

Atividade antioxidante; Biodisponibilidade; Caco-2; Compostos fenólicos; *Prunus avium L.*

# Abstract

The fruit of *Prunus avium L.*, commonly known as sweet cherry, is an excellent source of phytochemicals, namely phenolic compounds, which are secondary metabolites of plants and are characterized by having at least one aromatic ring with one or more hydroxyl groups attached. These compounds have aroused the interest of consumers in the recent years due to numerous benefits they present to the body. Its antioxidant activity, as well as all the processes triggered by it, are responsible for these same beneficial effects.

Thus, this study aimed to determine in vitro the bioavailability impact on the bioactivity of the phenolic compounds present in cherries. To do this, a cell line derived from the gastrointestinal tumor (Caco-2) was used, and the permeability and integrity of the monolayer formed by the aforementioned cell line was first investigated. After this the permeability was evaluated to the phenolic compounds contained in the cherry extract of the cultivar *Saco* digested and undigested. After incubation, the phenolic compounds that permeabilized the simulated membrane were quantified using the HPLC-DAD technique. At the same time, the antioxidant activity of the same compounds in the above-mentioned extracts was evaluated and an assay was carried out with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH).

The results obtained demonstrated that the phenolic compounds of the fruit of *Prunus avium L.* after undergoing a simulated digestion process, were absorbed by the cellular barrier, becoming bioavailable, however, in lower concentrations. Nevertheless, when the same cherry extract not subjected to digestion was placed in contact with the same cell layer only quercetin-3,4'-di-O-glycoside was able to become bioavailable. Also, the antioxidant activity was higher before passage through the cell monolayer, and the percentage of DPPH inhibition was 0% after this same process. Contrary to what was found after incubation with the in vitro digested extract, the integrity of the cell monolayer was altered and the permeability of the monolayer increased upon incubation with the crude extract. This suggests that the compounds which are present in the extract and interfere with the intercellular junctions undergo modifications after the digestion process and become more bioavailable, since they are degraded into smaller molecules. Also the absorption has been facilitated, increasing bioavailability. These factors have been found relevant for both cell integrity and permeability.

Considering the results obtained, this study suggests that digestion is an crucial process for the absorption, since without it the phenolic content of the food matrix does not become bioaccessible. Also, the function of the cell barrier was compromised upon incubation with the undigested extract.

It should be noted that the present work is only an *in vitro* assay and future investigations are necessary to corroborate the presented results. Thus, other *in vitro* and *in vivo* studies should be performed.

## **Keywords**

Antioxidant activity; Bioavailability; Caco-2; Phenolic compounds; *Prunus avium L.*

# Índice

1.	Introdução .....	1
1.1	Cerejas - Caracterização e Aspectos Nutritivos .....	1
1.2	Compostos Fenólicos .....	3
1.2.1	Caracterização bioquímica.....	3
1.2.2	Propriedades Biológicas .....	9
1.2.3	Extração e Quantificação .....	12
1.2.4	Determinação da atividade antioxidante.....	16
1.2.5	Compostos fenólicos no fruto de <i>Prunus avium L.</i> .....	16
1.3	Biodisponibilidade e bioacessibilidade.....	22
1.3.1	Determinação da biodisponibilidade .....	25
2.	Objetivos .....	29
3.	Materiais e métodos.....	31
3.1	Materiais .....	31
3.1.1	Compostos, soluções e meios de cultura .....	31
3.1.2	Equipamentos .....	32
3.2	Métodos .....	33
3.2.1	Preparação das amostras de cerejas.....	33
3.2.2	Digestão <i>in vitro</i> .....	34
3.2.3	Linhas Celulares .....	35
3.2.4	Quantificação e caracterização do perfil de compostos fenólicos através de HPLC-DAD .....	40
3.2.5	Avaliação da atividade antioxidante .....	42
3.2.6	Tratamento estatístico .....	43
4.	Resultados e Discussão.....	45
4.1	Determinação do rendimento de extração.....	45
4.2	Avaliação global do processo de digestão <i>in vitro</i> .....	46
4.3	Avaliação da resistência elétrica da membrana transendotelial de células Caco-2 .	47
4.4	Avaliação da permeabilidade da membrana transendotelial .....	49

4.5	Caracterização dos compostos fenólicos após digestão <i>in vitro</i> e após incubação celular .....	51
4.5.1	Quantificação dos compostos fenólicos após digestão <i>in vitro</i> e após incubação celular .....	51
4.6	Avaliação da atividade antioxidantes dos extratos após digestão <i>in vitro</i> e após incubação celular .....	56
5.	Conclusões e Perspetivas futuras .....	59
6.	Referências .....	61
Anexos	.....	69

# Índice de Figuras

Figura 1- Fruto de <i>Prunus avium</i> L. Adaptado (CERFUNDÃO, 2018).....	3
Figura 2- Estrutura química dos Flavonoides. Adaptado (Phenolic Compound Biochemistry, 2006).....	17
Figura 3 -Efeitos dos compostos fenólicos e implicações em doenças crônicas. Adaptado (Ferretti et al., 2010). ....	19
Figura 4- Mecanismos de passagem celular. Adaptado (Barthe, Woodley and Houin, 1999) ...	23
Figura 5-Modelo utilizado em estudos de biodisponibilidade com Caco-2. Adaptado (Devkar et al., 2015).....	28
Figura 6- Morfologia das células Caco-2 ao microscópio ótico composto em baixa e alta confluência (ATCC, 2018). ....	35
Figura 7- Aspeto da câmara de Neubauer (hemocitômetro) sob um microscópio óptico. ....	37
Figura 8- Estrutura química dos compostos fenólicos em estudo. Adaptado (Phenolic Compound Biochemistry, 2006). ....	41
Figura 9- Fruto de <i>Prunus avium</i> L. no início do processo de extração (Ramos, 2017). ....	45
Figura 10- Fruto de <i>Prunus avium</i> L. após extração (Ramos, 2017).....	46
Figura 11- Extrato de cereja antes da digestão (A), após digestão salivar (B), após digestão gástrica (C) e após digestão duodenal e biliar (D). ....	46
Figura 12-Valores da medição TEER antes e após 6 h de incubação da monocamada celular com os extratos de cereja. Os valores apresentados correspondem à média dos quadruplicado obtidos $\pm$ desvio-padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ ....	48
Figura 13-Percentagem de permeabilidade de células Caco-2 após 6 h de incubação com os extratos, comparativamente aos controlos ( $*p < 0,05$ ). ....	50

Figura 14-Concentração dos compostos fenólicos nas alíquotas recolhidas após os diferentes tempos de incubação com o extrato digerido ( $\mu\text{g/g}$ extrato).....	53
Figura 15 - Concentração de quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo nas alíquotas recolhidas após os diferentes tempos de incubação com o extrato bruto ( $\mu\text{g/g}$ extrato). .....	54
Figura 16 - Esquema síntese do processo de digestão e absorção dos compostos fenólicos presentes no fruto de <i>Prunus avium</i> L. ....	59

# Índice de Tabelas

Tabela 1- Classificação de compostos fenólicos. Adaptado (Phenolic Compound Biochemistry, 2006) .....	4
Tabela 2- Efeitos benéficos para a saúde dos compostos fenólicos presentes em cerejas. ....	20
Tabela 3-Quantidades pesadas para a preparação das soluções que simulam os fluidos da digestão in vitro. Adaptado (Versantvoort et al., 2005). .....	34
Tabela 4- Valores TEER obtidos na medição anterior à incubação com os extratos. Os valores apresentados correspondem à média dos quadruplicados obtidos $\pm$ desvio-padrão (D.P.). ....	47
Tabela 5- Valores TEER obtidos na medição posterior ao tempo máximo de incubação (6 h) com os extratos. Os valores apresentados correspondem à média dos quadruplicados obtidos $\pm$ desvio-padrão (D.P.). .....	47
Tabela 6- Percentagem de permeabilidade das células Caco-2 após 6 h de incubação com os extratos de cereja $\pm$ desvio-padrão (D.P.). .....	49
Tabela 7- Quantificação de compostos fenólicos para a variedade Saco 2017 $\pm$ desvio-padrão (D.P.). .....	51
Tabela 8- Concentração dos compostos fenólicos nas alíquotas recolhidas após os diferentes tempos de incubação com o extrato digerido ( $\mu\text{g/g}$ extrato) $\pm$ desvio padrão (D.P.). .....	52
Tabela 9- Atividade antioxidante dos extratos após os vários passos da digestão e tempos de incubação. ....	56
Tabela 10- Percentagem de cada composto que atravessa a monocamada celular relativamente à composição inicial do extrato (percentagem relativa à composição inicial no extrato de cereja (Ramos, 2017)). .....	57



## Lista de Acrónimos

ABTS	Ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfónico
BSA	Albumina de soro bovino
CAA	Atividade celular antioxidante
Caco-2	Linha celular derivada do carcinoma do cólon humano
CBG	$\beta$ -glucosidase citosólica
COMT	catecol-O-metiltransferase
COX II	Ciclooxigenase II
CRP	Proteína C reativa
DAD	Detetor de <i>diode array</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	1,1-difenil-2-picrilhidrazil
ECD	Detetor de eletroquímica
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FLD	Detetor de fluorescência
FBS	Soro fetal de bovino
FRAP	Poder antioxidante de redução do ferro
Gpx	Glutathione peroxidase eritrocitária
HBSS	Solução salina equilibrada de Hank
HepG-2	Linha celular derivada de adenocarcinoma hepático humano
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de <i>diode array</i>
HPLC-FLD	Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de fluorescência
HT-29	Linha celular derivada de adenocarcinoma de cólon humano
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LPH	Lactase de floridizina hidrolase
Ly	Lucifer yellow
MS	Espectrometria de massa
MTT	Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
ORAC	Capacidade de absorção do radical de oxigênio
PBS	Tampão fosfato salino
pH	Potencial de hidrogênio
pKa	Potencial constante de acidez
PPAR- $\alpha$	Recetor ativado por proliferador de peroxissoma $\alpha$
PPAR- $\gamma$	Recetor ativado por proliferador de peroxissoma $\gamma$
P-PST	Fenol sulfotransferase
ROS	Espécies reativas de oxigênio

RPM	Rotações por minuto
RPMI-C	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i> completo
RPMI-I	<i>Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium</i> incompleto
SOD	Superóxido dismutase
T84	Linha celular derivada de carcinoma colorretal humano
TEAC	Capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox
TEER	Ensaio da resistência elétrica transendotelial
TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral $\alpha$
TRAP	Potencial antioxidante total
UDPGT	UDP glucuronosil transferase
UV	Ultravioleta
UV-A	Radiação ultravioleta A
UV-B	Radiação ultravioleta B

# 1. Introdução

## 1.1 Cerejas - Caracterização e Aspectos Nutritivos

O fruto de *Prunus avium L.*, (figura 1) conhecida como cereja, pertence à família Rosaceae, subfamília Prunoideae e ao género *Prunus* (Ferretti *et al.*, 2010), (Bastos *et al.*, 2015). Apenas este tipo de cereja e a *Prunus cerasus L.*, vulgarmente conhecida como ginja ou cereja ácida, são consumidas. Normalmente consomem-se cruas, devido às suas características organolépticas, mas também podem ser processadas, de modo a gerar outros produtos como geleias, licores, sumos ou compotas (Nawirska-Olszańska *et al.*, 2017).

A cereja é uma cultura importante, sendo mais prevalente em zonas de clima temperado, nomeadamente na Ásia, onde teve origem, Europa, norte de África, Austrália e Nova Zelândia e zonas temperadas do continente americano (Commisso *et al.*, 2017), (Bastos *et al.*, 2015). No passado, os EUA foram os maiores exportadores deste fruto, porém atualmente, é a Turquia quem mais produz cerejas, seguido dos EUA e depois o Irão (McCune *et al.*, 2010). Em Portugal, são produzidas mais de 15 mil toneladas de cerejas por ano, na região nordeste do país (Serra *et al.*, 2011). Cada variedade difere no período de colheita e na resistência a pragas, também propriedades como tamanho, cor da pele e da polpa, consistência, doçura, acidez e firmeza variam (Ferretti *et al.*, 2010), (Commisso *et al.*, 2017). Estas características devem-se aos seus constituintes bioquímicos e por isso este fruto assume uma grande importância, sendo não só apreciado pelos consumidores, como também pela comunidade científica devido às suas propriedades nutricionais e bioativas (Bastos *et al.*, 2015).

Os hidratos de carbono são os constituintes mais abundantes seguidos das proteínas, também a água está presente em elevadas quantidades. Contrariamente, os níveis de gorduras saturadas são baixos, nem sendo detetado colesterol. As cerejas têm, assim, um baixo teor de gordura e um índice glicémico reduzido, o que resulta num valor energético de aproximadamente 58 kcal / 100 g de fruta fresca (Bastos *et al.*, 2015). Estão também presentes vitaminas hidrossolúveis (C e B) e lipossolúveis (A, E e K), alguns carotenoides como o betacaroteno e, em menor quantidade, luteína e zeaxantina e alguns minerais, como o cálcio, magnésio, fósforo e potássio (Ferretti *et al.*, 2010), (Commisso *et al.*, 2017). Cada cereja tem aproximadamente 260 mg de potássio, sendo uma boa fonte do mesmo e contribuindo para a diminuição do risco de hipertensão e acidentes vasculares cerebrais que têm sido descritos como consequência do consumo deste mineral (McCune *et al.*, 2010). A promoção do consumo de alimentos com alto teor de potássio e baixo teor de sódio em simultâneo, como é o caso das cerejas, promove a natriurese, diminuição da atividade do sistema nervoso simpático e a estimulação indireta da noradrenalina e angiotensina II

contribuindo, assim, para a redução de hipertensão (McCune *et al.*, 2010). As cerejas são também uma boa fonte de fibra, contendo aproximadamente 2,1g de fibra / 100g de fruta e contribuindo, assim, para um melhor controlo da glucose no sangue e redução dos níveis de colesterol, podendo exercer efeitos na saciedade e consequentemente no controlo do peso (McCune *et al.*, 2010).

Foi evidenciada a presença de alguns ácidos orgânicos como é o caso dos ácidos ascórbico, fumárico, shiquímico, cítrico, succínico, láctico, oxálico e málico, sendo a quantidade deste último juntamente com a de açúcares determinantes para a doçura, que em conjunto com a firmeza e a cor verde dos pés, são cruciais para a aceitação do fruto por parte do consumidor (Ferretti *et al.*, 2010), (Commisso *et al.*, 2017), (Bastos *et al.*, 2015), (María Serrano *et al.*, 2005). Serrano *et al.* (María Serrano *et al.*, 2005), os quais em 2005 avaliaram o teor de alguns destes ácidos em diferentes estados de desenvolvimento das cerejas, verificaram que o ácido málico aumenta de  $0,59 \pm 0,09$  para  $1,24 \pm 0,04\%$  no decorrer do desenvolvimento, ao contrário dos ácidos cítrico e succínico que não se alteram significativamente. Estes autores verificaram ainda que os níveis de ácido ascórbico diminuem para metade nas primeiras fases de desenvolvimento e, em seguida, aumentam progressivamente até ao final do processo de amadurecimento atingindo a concentração final de  $27,96 \pm 1,50$  mg /100 g de fruta (María Serrano *et al.*, 2005). Avaliaram também a variação de açúcares tendo verificado que a frutose e a glucose se vão acumulando linearmente no decorrer do desenvolvimento, atingindo as concentrações finais de  $8,43 \pm 0,13\%$ , e  $6,57 \pm 0,01$  respetivamente. No que respeita à sacarose e ao sorbitol, verificou-se que as concentrações são muito baixas e não sofrem alterações significativas ao longo do desenvolvimento (María Serrano *et al.*, 2005). Num outro estudo efetuado por Bastos *et al.* (Bastos *et al.*, 2015), em que quantificaram os açúcares presentes nas cerejas, foi detetada glucose em maior quantidade, seguido de frutose e ainda sorbitol. Também detetaram ácidos gordos como os ácidos linoleico, oleico, palmítico e  $\alpha$ -linolénico, tendo verificado que os ácidos gordos polinsaturados se encontram em maiores quantidades que os saturados e monoinsaturados. O  $\alpha$ -tocoferol foi detetado como o tocoferol mais abundante (Bastos *et al.*, 2015).

Todos estes compostos conferem às cerejas um elevado valor nutritivo, porém este fruto é também uma fonte de compostos bioativos, nomeadamente compostos fenólicos, incluindo ácidos fenólicos (derivados hidroxicinâmicos), flavonoides e antocianinas, que apresentam efeitos biológicos benéficos, aumentando, assim, a sua importância (Wang *et al.*, 2017), (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2016), (Bastos *et al.*, 2015).

O consumo de cerejas tem sido associado a efeitos benéficos na saúde e, portanto, tem sido colocada a hipótese de que estes se devem aos compostos bioativos já referidos. Perante isto, a informação sobre o conteúdo bioativo e a atividade antioxidante das cerejas é um dos aspetos cruciais para promover o seu consumo (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2016).



Figura 1- Fruto de *Prunus avium* L. Adaptado (CERFUNDÃO, 2018)

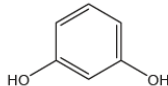
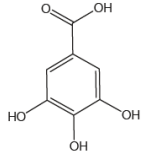
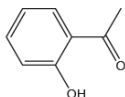
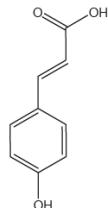
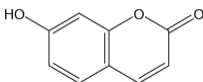
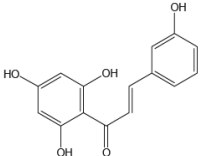
## 1.2 Compostos Fenólicos

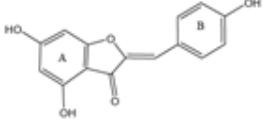
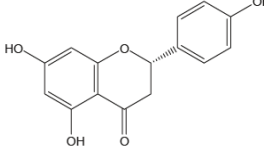
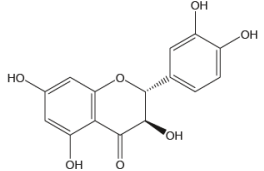
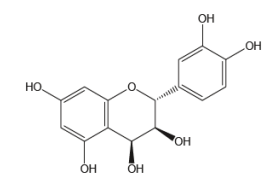
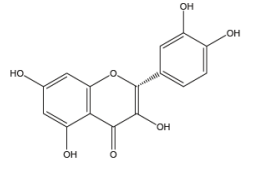
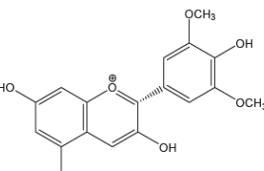
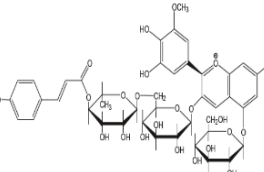
### 1.2.1 Caracterização bioquímica

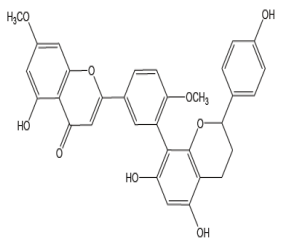
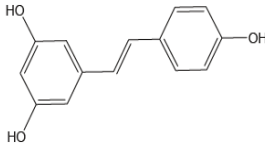
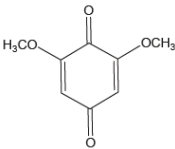
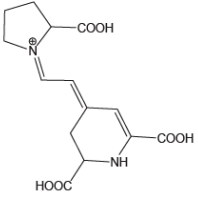
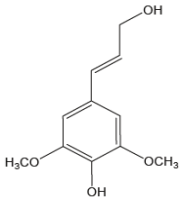
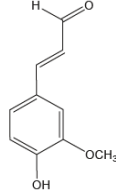
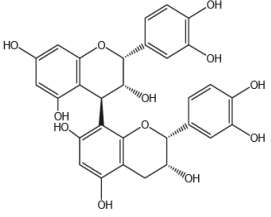
Os compostos fenólicos são um dos principais metabolitos secundários das plantas, caracterizados por terem pelo menos um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilo ligados, o que os torna estruturalmente e funcionalmente muito diversos (Ferretti *et al.*, 2010), (Somoza *et al.*, 2015), (Haminiuk *et al.*, 2012). São essenciais para várias funções nas plantas e responsáveis pelas propriedades organolépticas e nutricionais de alimentos derivados de plantas, bem como pelas interações físico-químicas que resultam na cor que é observada nos frutos (Somoza *et al.*, 2015). Estas substâncias são sintetizadas durante o desenvolvimento das plantas em resposta a *stress* e radiação UV e desempenham funções importantes nas mesmas (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014), (Haminiuk *et al.*, 2012). Servem como barreiras físicas e químicas, uma vez que fazem parte da constituição da parede celular, protegem contra a invasão de agentes patogênicos, pois possuem atividade antifúngica e antibacteriana, interferindo também na biossíntese de micotoxinas (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014), (Li *et al.*, 2014). Estão também envolvidos nos mecanismos de defesa contra insetos e outros animais, uma vez que atuam como dissuasores de herbívoros, e funcionam como fotoprotetores contra a radiação UV (Somoza *et al.*, 2015), (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014). Estes compostos também estão envolvidos na modulação dos processos fisiológicos das plantas, nomeadamente no metabolismo e transporte, tendo também a função de moléculas sinalizadoras, por exemplo, na polinização e na simbiose (Somoza *et al.*, 2015).

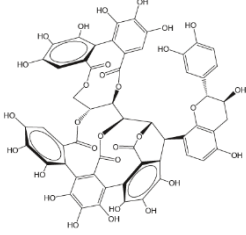
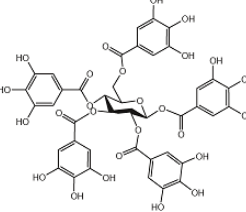
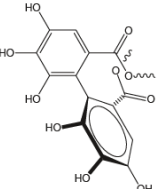
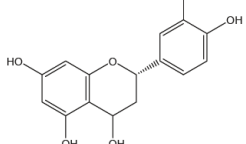
Os polifenóis variam de moléculas simples, de baixo peso molecular e com apenas um anel aromático aos taninos complexos, e podem ser classificados segundo critérios distintos (Ferretti *et al.*, 2010). Em 1962, Swain e Bate-Smith, agruparam os compostos fenólicos nas categorias de “comum” e “menos comum” (*Phenolic Compound Biochemistry*, 2006). Dez anos depois, também Ribéreau-Gayon agrupou os fenóis em três famílias. A primeira denominava-se fenóis amplamente distribuídos, e compreendia fenóis presentes em todas as plantas, ou de importância numa planta específica. A segunda tinha como nome fenóis menos distribuídos que compreende compostos com número limitado de compostos fenólicos conhecidos. Por fim, a terceira família diz respeito a componentes fenólicos presentes como polímeros (*Phenolic Compound Biochemistry*, 2006). Porém, existe uma classificação mais aceita elaborada por Harbone e Simmonds, em 1964, que tem como base o número de carbonos existentes na molécula (*Phenolic Compound Biochemistry*, 2006). Torna-se então possível distinguir catorze classes cumprindo este critério e as mesmas encontram-se resumidas na seguinte tabela (tabela 1).

Tabela 1- Classificação de compostos fenólicos. Adaptado (*Phenolic Compound Biochemistry*, 2006)

Classe	Esqueleto	Nome do Composto	Estrutura Química	
Fenóis simples	C <sub>6</sub>	1,3-dihidroxibenzeno		
Ácidos fenólicos e compostos relacionados	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácido gálico		
Acetofenonas e ácidos fenilacéticos	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	2-Hidroxiacetofenona		
Ácidos cinâmicos	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácido <i>p</i> -coumarínico		
Coumarinas e isocoumarinas	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Umbeliferona		
Flavonoides:	Chalconas	C <sub>15</sub>	Buteína	

	Auronas	C <sub>15</sub>	Aurona	
Flavonoides típicos:	Flavanonas	C <sub>15</sub>	Naringenina	
	Flavanois	C <sub>15</sub>	Taxifolina	
	Flavanos	C <sub>15</sub>	Leucocianidina	
	Flavonas	C <sub>15</sub>	Quercetina	
	Antocianidinas e desoxiantocianidinas	C <sub>15</sub>	Malvidina	
	Antocianinas	C <sub>15</sub>	Petanina	

<b>Biflavonóis</b>	$C_{30}$	<b>Ginkgetina</b>	
<b>Benzofenonas, xantonas e estilbenos</b>	$C_6-C_1-C_6,$ $C_6-C_2-C_6$	<b>Resveratrol</b>	
<b>Benzoquinonas, antroquinonas e naftoquinonas</b>	$C_6, C_{10}, C_{14}$	<b>2,6-dimetoxibenzoquina</b>	
<b>Betacianinas</b>	$C_{18}$	<b>Indicaxantina</b>	
<b>Lignanos</b>	Dímeros ou oligômeros	<b>Álcool sinapil</b>	
<b>Lignina</b>	Polímeros	<b>Coniferaldeído</b>	
<b>Taninos</b> Taninos condensados :	Oligômeros ou polímeros	<b>procianidina B2</b>	

Taninos complexos	Oligómeros ou polímeros	Acutissimina A		
Taninos hidrolisáveis :	Galotaninos	Oligómeros ou polímeros	1,2,3,4,6-pentagalactoglucos e	
	Elagitaninos	Oligómeros ou polímeros	R-hexahidroxidifenol (HHDP)	
Flobafenos		Polímeros	Luteoferol	

Os ácidos fenólicos simples e os flavonóides são os compostos fenólicos mais comuns (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014). Estes últimos são os principais compostos bioativos encontrados nas frutas, sendo também responsáveis pelas cores amarela, vermelha e azul. Apresentam-se, na natureza, como O-glicosídeos quando têm uma ou várias porções de açúcares ligadas através de um grupo hidroxilo, como C-glicosídeos quando essas ligações são carbono-carbono, ou podem não se encontrar ligados a nenhum glúcido, tendo o nome de agliconas (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014), (Haminiuk *et al.*, 2012). Por outro lado, os ácidos fenólicos, que representam quase um terço dos compostos fenólicos da dieta, encontram-se covalentemente ligados a componentes estruturais da parede celular, como a celulose, hemicelulose, lignina, pectina e proteínas estruturais (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014), (Haminiuk *et al.*, 2012). Os taninos, são outro grupo de compostos fenólicos, presentes em folhas, revestimento do tronco e frutos estabelecendo proteção contra infecções (*Phenolic Compound Biochemistry*, 2006). Este grupo de fenóis também é responsável pelas propriedades organolépticas, nomeadamente pela adstringência, que se deve à interação de taninos com as proteínas presentes na saliva (Somoza *et al.*, 2015), (Li *et al.*, 2014).

Os estilbenos são fenóis menos predominantes na dieta humana. O resveratrol, na forma glicosilada, é o estilbeno mais presente e é encontrado na pele das uvas vermelhas. É produzido sobretudo em videiras aquando de lesões e infeções fúngicas. Os lignanos são outra classe de fenóis que não são ingeridos em grande quantidade. Estima-se que a ingestão média por dia é de 233,6 µg. Estão presentes nos frutos em pequenas quantidades, podendo ser encontrados, ainda que em baixas concentrações, em morangos. Aparecem em quantidades superiores em alimentos como a linhaça (Haminiuk *et al.*, 2012).

Os compostos fenólicos podem existir nas formas livre ou conjugada com compostos solúveis ou insolúveis (Wang *et al.*, 2017). Os compostos solúveis são na sua maioria fenilpropanoides, flavonoides e quinonas, enquanto que os insolúveis são sobretudo taninos condensados, ligninas e ácidos hidroxicinâmicos ligados à parede celular (Haminiuk *et al.*, 2012). Na maioria dos frutos e vegetais os fitoquímicos encontram-se nas formas livres ou conjugadas solúveis, estando os compostos fenólicos conjugados presentes em 24% das matrizes alimentares (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014). Estes estão normalmente conjugados com um ou mais resíduos de açúcares ou com aminas, ácidos carboxílicos e orgânicos, lípidos ou outros fenóis (Li *et al.*, 2014). Por outro lado, os ácidos fenólicos encontram-se principalmente nas formas insolúveis (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014). Estas formas têm elevada importância para a saúde e protegem o organismo do *stress* oxidativo por intermédio dos seus efeitos antioxidantes (Wang *et al.*, 2017). As suas propriedades anti-inflamatórias também têm vindo a ser demonstradas em vários estudos *in vivo* e *in vitro*, nomeadamente em frutos como a cereja e, dada a sua importância, serão abordados adiante (Wang *et al.*, 2017).

A maioria dos frutos tem uma carga fenólica significativa associada à pele, mas também outros produtos alimentares como vegetais, cereais, chás, microalgas e flores comestíveis possuem compostos fenólicos (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014), (Li *et al.*, 2014). A composição fenólica em frutos varia consideravelmente, contendo sobretudo flavonoides, ácidos hidroxicinâmicos e hidroxibenzoicos (Haminiuk *et al.*, 2012). De entre os frutos é possível distinguir as uvas, azeitonas, mirtilos, mangas e frutos cítricos como aqueles cujo teor em fenóis é mais elevado (Li *et al.*, 2014). Contudo, também os vegetais são ricos em polifenóis. O conteúdo fenólico mais elevado foi encontrado em brotos chineses, raiz de lótus, folha de batata doce, feijão verde de soja, folha de ginseng, cebolinho e brócolos (Li *et al.*, 2014). Assim, os vegetais são importantes na dieta, pois são uma boa fonte de compostos fenólicos (Li *et al.*, 2014). Os cereais são outra fonte de fenóis, os pigmentados como o arroz preto, vermelho e roxo são os que possuem teores mais elevados (Li *et al.*, 2014). Também plantas medicinais e flores comestíveis apresentam elevados índices de fenóis (Li *et al.*, 2014).

O conteúdo fenólico pode ser bastante variável estando dependente de vários fatores (Li *et al.*, 2014). Os diferentes tipos de cultura e respetivo grau de amadurecimento aliado à

exposição solar e precipitação podem ser decisivos para as concentrações e proporções dos diferentes compostos fenólicos nas variedades, sendo mais comum o aumento das concentrações de antocianinas ao longo do amadurecimento e a diminuição de ácidos fenólicos (Li *et al.*, 2014). Também métodos inadequados de cozedura podem levar à diminuição do conteúdo fenólico, por exemplo, a cenoura após fervura perde completamente o conteúdo fenólico, por outro lado o brócolo e a abóbora perdem mais conteúdo fenólico durante a cozedura em água, sendo o melhor método a cozedura a vapor (Li *et al.*, 2014). Outro importante fator na determinação do conteúdo fenólico é o armazenamento. Vários estudos realizados em diferentes frutos revelaram a variação da composição fenólica ao longo do tempo. Gliszczynska-Swiglo *et al.* (Gliszczynska-Swiglo and Tyrakowska, 2003) efetuaram um estudo utilizando sumo de maçã e verificaram que onze meses depois de armazenado a concentração de ácidos fenólicos diminuiu entre 5% a 21%. Também se verificou a diminuição de ácido p-cumárico em framboesas congeladas (William Mullen *et al.*, 2002). Outro estudo mostrou que a atividade antioxidante em azeite extra virgem diminuiu depois de oito meses de armazenamento (Vera Lavelli, Giuseppe Fregapane and Salvadorš, 2006). No mesmo período de tempo, verificou-se também um aumento do conteúdo de tirosol e hidroxitirosol devido à hidrólise de fenóis complexos (D'Archivio *et al.*, 2010).

Para além do valor nutricional, os compostos fenólicos também têm aplicação noutras áreas. São tradicionalmente usados como corantes e conservantes na indústria alimentar, devido às suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Somoza *et al.*, 2015), (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Uribe and Serna-Saldívar, 2014). Outra aplicação comum é na síntese de cosméticos, fármacos e nutracêuticos (Somoza *et al.*, 2015), (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Uribe and Serna-Saldívar, 2014). O ácido ferúlico é comumente usado como precursor do ácido vanílico, um agente aromatizante, e também como conservante alimentar (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Uribe and Serna-Saldívar, 2014). Atualmente, os polifenóis têm também despertado interesse na produção de material biológico (Somoza *et al.*, 2015).

### 1.2.2 Propriedades Biológicas

Vários estudos em modelos animais e humanos têm demonstrado que os compostos fenólicos exercem um papel protetor contra o *stress* oxidativo e em danos causados por radicais livres (Ferretti *et al.*, 2010). Estes causam alterações estruturais e funcionais nas macromoléculas podendo levar ao aparecimento de inúmeras doenças crónicas (Ferretti *et al.*, 2010), (Haminiuk *et al.*, 2012). Contudo, estas podem ser travadas devido ao poder antioxidante dos fenóis que conseguem neutralizar e eliminar os radicais livres, ou permitem que outras moléculas o façam (Ferretti *et al.*, 2010). Estudos *in vitro* demonstraram que eles são capazes de proteger o DNA de eventuais danos e os lípidos e proteínas da oxidação por estimulação de cascatas de sinalização de células antioxidantes e anti-inflamatórias endógenas, conseguindo

reduzir a formação de hidroperóxidos (Cheyner, Tomas-Barberan and Yoshida, 2015), (Li *et al.*, 2014). Os danos oxidativos estão também ligados ao envelhecimento e a doenças associadas à idade, contudo estudos sugerem que estes podem regredir com o consumo de alimentos ricos em compostos fenólicos (Haminiuk *et al.*, 2012). Estudos *in vivo* permitiram verificar que os polifenóis podem também exercer o seu efeito antioxidante através do plasma, fatores de transcrição e enzimas. Em ensaios clínicos onde os indivíduos consumiram extrato de uva, verificou-se que, a curto prazo os fenóis eram libertados e ligavam-se à fração lipídica do soro, reduzindo a peroxidação lipídica, do mesmo modo, a longo prazo, constatou-se uma diminuição dos níveis de colesterol LDL oxidado (Li *et al.*, 2014). A inibição de danos no DNA mediada por cobre e vários compostos como a epicatequina, ácido protocatequico, galactoside de n-propilo, ácido vanílico, quercetina, miricetina, epicatequina-3-galactoside, epigallocatequina, epigallocatequina-3-galactoside e ácido gálico também está descrita (Perron *et al.*, 2011). Outros estudos demonstraram ainda que os fenóis conjugados e insolúveis têm maior capacidade antioxidante que os fenóis livres ou conjugados solúveis (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014). Em suma, os mecanismos usados pelos compostos fenólicos enquanto antioxidantes são a transferência de átomos de hidrogénio, transferência de eletrões ou ação quelante de metais de transição pelos seus grupos hidroxilo (Redondo *et al.*, 2017), (Li *et al.*, 2014).

Os compostos fenólicos apresentam inúmeros benefícios na regressão do envelhecimento a nível neuronal e comportamental e consequentemente resultam numa diminuição da incidência de doenças associadas à idade (Li *et al.*, 2014). Estudos *in vitro* comprovaram que os compostos fenólicos são capazes de exercer atividade neuroprotetora, inibindo a lesão tecidual provocada por peróxido de hidrogénio (Jin *et al.*, 2014). As propriedades dos fenóis também permitem a redução do risco de desenvolvimento de doenças neurodegenerativas, por ação da sua atividade antioxidante e capacidade de quelar metais como o ferro (Li *et al.*, 2014).

Os benefícios dos polifenóis também estão descritos para doenças de longa duração e progressão lenta, como é o caso das doenças cardiovasculares, respiratórias, cancro e diabetes. Está evidenciado que o consumo de compostos fenólicos estimula a vasodilatação, reduz a vascularização e a hiperlipidémia, conduzindo a uma regressão da aterosclerose (Li *et al.*, 2014), (Haminiuk *et al.*, 2012). O risco de trombose também pode ser reduzido com o consumo destes compostos, levando a uma menor incidência de enfarte do miocárdio, doenças cardíacas e isquémia (Li *et al.*, 2014). Em estudos epidemiológicos verificou-se que na área do mediterrâneo a incidência de doenças cardiovasculares é substancialmente mais baixa. Na origem destes resultados está a dieta aqui realizada que é rica em alimentos com níveis elevados de polifenóis (Li *et al.*, 2014). Tanto em estudos epidemiológicos como em estudos experimentais verificou-se que o consumo moderado de vinho, particularmente de vinho tinto, reduziu a taxa de mortalidade por doença cardíaca coronária. Estes efeitos cardioprotetores devem-se ao teor de fenóis antioxidantes, nomeadamente o resveratrol e

proantocianidinas, que conseguem eliminar as espécies reativas de oxigênio (ROS) (Li *et al.*, 2014). Thuc *et al.* investigaram o efeito do resveratrol em isquemia cardíaca tendo verificado que existia uma recuperação funcional do tecido cardíaco e uma redução de ROS (Thuc *et al.*, 2012). Outro estudo realizado com vinho branco, em que foi observada a redução de cardiomiócitos em apoptose, permitiu concluir que este é igualmente cardioprotetor, uma vez que contém monofenóis e ácidos hidroxicinâmicos (Li *et al.*, 2014).

Os compostos fenólicos também são referidos como desempenhando um papel anticancerígeno importante (Li *et al.*, 2014). Estudos epidemiológicos demonstraram que a ingestão diária de alimentos ricos em fenóis previne alguns tipos de cancro, principalmente os do trato gastrointestinal como é o caso dos cancros da boca, estômago, duodeno e cólon, mas também outros como o cancro do fígado, pulmão, glândula mamária ou pele (Li *et al.*, 2014), (Haminiuk *et al.*, 2012). Num estudo realizado numa linha celular de carcinoma mamário, verificou-se uma diminuição da viabilidade celular, depois de expostas ao conteúdo fenólico presente em azeite extra virgem (Reboredo-Rodríguez *et al.*, 2018). Também o efeito dos polifenóis na angiogénese tem sido averiguado. Foram estudados seis extratos de frutos vermelhos quanto às suas propriedades anti-angiogénicas, tendo-se verificado que depois da exposição aos extratos o fator de crescimento endotelial vascular ficou com a sua expressão inibida (Li *et al.*, 2014). Outro estudo realizado em em chá Kuding permitiu concluir que os compostos fenólicos também são indutores da apoptose em linhas celulares cancerígenas (Zhao *et al.*, 2014). Para além dos estudos já referidos muitos outros têm sido realizados com o intuito de perceber qual o efeito de diferentes fenóis a nível oncológico.

Os compostos fenólicos também têm sido estudados devido aos seus efeitos na diabetes (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Uribe and Serna-Saldívar, 2014). Estudos epidemiológicos demonstraram que a ingestão diária de alimentos derivados de plantas previne a incidência de diabetes. Testes *in vitro* também mostraram que os fenóis melhoram a secreção de insulina (Haminiuk *et al.*, 2012).

A inflamação é um fator de risco para muitas doenças, como as referidas em cima, mas também para outras como obesidade e doenças neurodegenerativas (Mikulic-Petkovsek *et al.*, 2016). Os compostos fenólicos possuem propriedades anti-inflamatórias (Li *et al.*, 2014). Estudos comprovam que os polifenóis presentes em cogumelos possuem um forte potencial anti-inflamatório, conseguindo exercer o seu efeito em macrófagos ativados (Taofiq *et al.*, 2015). Noutros alimentos como as uvas, também foi demonstrada a diminuição da inflamação, por ação dos compostos fenólicos aqui presentes (Chuang and McIntosh, 2011). Vários outros estudos têm sido realizados ao longo dos anos, e os resultados permitem concluir que os polifenóis atuam não só como moduladores das vias de sinalização inflamatórias, mas também a nível da expressão génica de várias células, exercendo assim os seus efeitos (Li *et al.*, 2014).

Os compostos fenólicos têm também demonstrado atividades antibacteriana, antifúngica e antiviral (Li *et al.*, 2014). Estudos realizados com folhas de tabaco permitiram concluir que os polifenóis que estas contêm conseguem inibir a proliferação de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* (Li *et al.*, 2014). Os compostos fenólicos também se mostraram capazes de suprimir fatores de virulência, conseguindo diminuir a adesão dos ligandos ao hospedeiro, inibir a formação de biofilmes e neutralizar toxinas (Daglia, 2012). A atividade antifúngica também foi demonstrada numa ampla quantidade de polifenóis (Karioti *et al.*, 2011).

Em suma, podemos verificar que os compostos fenólicos, são fitoquímicos muito promissores e as investigações sobre o seu perfil bioquímico são importantes para que se possa compreender a sua atividade protetora e os benefícios para a saúde.

### 1.2.3 Extração e Quantificação

A preparação de amostras é o primeiro e mais importante passo no processo de quantificação de fitoquímicos a partir de material vegetal (Haminiuk *et al.*, 2012). Este processo pode ser influenciado por inúmeros fatores, de modo a que para se obter uma posterior extração máxima, vários parâmetros devem ser testados como é o caso do solvente, agitação, tempo de extração, temperatura, relação soluto-solvente, eficiência da transferência de massa e tamanho das partículas (Haminiuk *et al.*, 2012).

Quando se trata de frutos, para que o rendimento da extração dos polifenóis seja ideal, este processo deve ser realizado em amostras de material fresco. Porém nem sempre é possível conservar este tipo de amostras sem que estas se degradem. Deste modo, vários têm sido os processos usados para preservar as amostras, nomeadamente processos de congelamento e secagem. Contudo, também está descrito que estes processos quando usados a longo prazo causam perda na quantidade de polifenóis presentes nos frutos (Haminiuk *et al.*, 2012). Como alternativa a estes processos, surge a liofilização que tem sido muito utilizada. Este processo consiste na remoção da água presente em alimentos, conseguindo assim melhorar a estabilidade a longo prazo, uma vez que diminui a possibilidade de crescimento de microrganismos e de oxidação dos compostos de interesse (Ignat, Volf and Popa, 2011).

Depois de obtida e preparada a amostra, é necessário efetuar a extração dos compostos de interesse. A transformação da amostra vegetal em pó fino aumenta a eficiência do processo de extração, pois aumenta a área superficial da amostra (Haminiuk *et al.*, 2012). Os compostos fenólicos naturais são normalmente extraídos com solventes orgânicos como é o caso de álcoois (metanol e etanol), acetona, éter dietílico e acetato de etilo. No caso dos ácidos fenólicos, compostos extremamente polares, não deve ser aplicado o solvente orgânico

puro, é recomendado para estes casos aumentar a polaridade do solvente usando misturas de álcool-água ou acetona-água, podendo também os solventes acidificados ou refrigerados serem uma opção (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014), (Haminiuk *et al.*, 2012).

Diferentes técnicas de extração também estão disponíveis para polifenóis. A extração sólido-líquido é uma das mais usadas. Consiste na remoção dos compostos solúveis de uma matriz por migração dos mesmos para o solvente. É um processo simples e eficiente, utilizado para recuperar compostos fenólicos a partir de amostras de frutos e outros materiais vegetais, que pode ser otimizado por alteração dos gradientes de concentração e coeficientes de difusão (Haminiuk *et al.*, 2012). Também a extração sólido-líquido combinada com ultrassom tem sido descrita (Wang and Zuo, 2011). Esta permite extrair analitos de diferentes matrizes num período de tempo inferior ao despendido noutras técnicas. Porém, este método tem algumas desvantagens, como é o caso da co-extração de outros componentes que não os de interesse, dos quais os mais frequentes são proteínas, açúcares e ácidos orgânicos. Estes últimos podem interferir com os processos de quantificação dos compostos fenólicos (Ignat, Volf and Popa, 2011). Contudo, é possível contornar esse inconveniente recorrendo a cartuchos de extração em fase sólida C<sub>18</sub>, obtendo-se assim a separação entre o conteúdo fenólico e não fenólico e, conseqüentemente, levando à obtenção de resultados mais precisos (Haminiuk *et al.*, 2012), (Wang and Zuo, 2011). Está também referenciada a extração de polifenóis assistida por micro-ondas. Tem a vantagem de se poder efetuar rapidamente e com reduzidos custos, uma vez que o consumo de solventes é menor também (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014). Esta técnica combina alta pressão e temperatura, conseguindo uma libertação ideal de ácidos fenólicos por degradação das paredes celulares, hemicelulose e lignina presentes nas plantas. O isolamento de polifenóis com recurso à técnica de extração de fluídos supercríticos também tem sido utilizado. É uma técnica mais seletiva e menos tóxica, onde o fluido mais utilizado é o dióxido de carbono. No entanto, os equipamentos necessários para este processo são de custo elevado e manuseamento complexo (Haminiuk *et al.*, 2012). Também é frequente o uso dos vários tipos de hidrólise como método de extração. As hidrólises ácidas e alcalinas são as mais usuais para extração de compostos fenólicos (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014). Vários aspetos podem condicionar estes processos, nomeadamente, a concentração de ácido ou base, tempo e temperatura de hidrólise. A hidrólise com ácido permite a quebra das ligações glicosídicas e a solubilização dos açúcares, deixando as ligações de éster intactas (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014). Porém quando esta reação ocorre a temperaturas elevadas pode levar à perda de alguns fenóis. A hidrólise alcalina é mais eficaz na extração de compostos fenólicos e conduz a menos perdas, permite a quebra de ligações éster que liga os ácidos fenólicos à parede celular, conseguindo que estes se libertem dos polissacáridos (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014). Este processo reacional ocorre geralmente à temperatura ambiente, havendo a possibilidade de se efetuar a diferentes

concentrações e por diferentes períodos de tempo. Todas estas variações são cruciais para a libertação de polifenóis. Outros tipos de hidrólise estão descritos. A hidrólise enzimática, tal como o próprio nome indica, é um processo onde se usam enzimas como pectinases, celulases, amílases, hemicelulases e glucanases para hidrolisar hidratos de carbono (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014). Este é um método muito eficaz e específico para a libertação de compostos fenólicos. Estão também descritas hidrólises combinadas com outras metodologias. O recurso a ultrassons, radiação infravermelha e campo elétrico pulsado pode também ser usado para a libertação de compostos fenólicos, mas são menos usuais (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014).

Após a extração pode-se efetuar um passo de purificação, que tem como objetivo a eliminação de alguns interferentes que são extraídos ao mesmo tempo que os compostos fenólicos, levando à obtenção de resultados mais fidedignos (Grigoras *et al.*, 2012). O passo seguinte é a deteção e quantificação, cujos processos se encontram amplamente descritos na literatura. Um método muito usado é o ensaio de Folin-Cionalteu, o qual permite a determinação de fenóis totais, contudo não consegue detetar todos os grupos fenólicos, e pode sofrer interferência com o ácido ascórbico e alguns açúcares (Stalikas, 2007). Outro método utilizado é o ensaio colorimétrico de cloreto de alumínio, que permite quantificar os flavonoides totais (Haminiuk *et al.*, 2012). Também é usual a determinação de antocianinas totais pelo método diferencial de pH onde se mede a absorvância a pH 1 e 4,5 e se avalia a transformação estrutural do cromóforo presente nestes compostos (Haminiuk *et al.*, 2012). Contudo, a metodologia mais usual para a deteção e quantificação de compostos fenólicos é a cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) e devido à sua importância no presente trabalho será explicada a seguir de forma mais detalhada.

O equipamento de HPLC é um conjunto de vários componentes que, tal como o próprio nome indica, permite a separação física dos constituintes de uma matriz, de forma rápida e fácil, a partir de uma amostra no estado aquoso (Haminiuk *et al.*, 2012). É possível distinguir entre dois tipos de cromatografia líquida, a de fase normal, onde a fase estacionária é mais polar que a fase móvel, e a de fase reversa, onde, pelo contrário, a fase estacionária é menos polar que a fase móvel (Haminiuk *et al.*, 2012). Habitualmente, a fase estacionária consiste numa coluna cromatográfica de tamanho variável, cujo revestimento é feito com partículas de sílica. Ambos os aspetos referidos são fundamentais, uma vez que é deles que depende a precisão e eficiência de separação. Enquanto que o aumento do comprimento da coluna aumenta a separação dos picos devido ao aumento do tempo de eluição, a diminuição do tamanho da partícula que a constitui leva a um aumento da superfície de contacto por aumento da adsorção (Haminiuk *et al.*, 2012), (Bird, 1989), (Scott, 1995), (Günzler and Williams, 2001). Por outro lado, a fase móvel é um líquido que passa pela fase estacionária a uma determinada pressão e velocidade de fluxo, com o objetivo de eluir os compostos nesta retidos. Assim, os compostos vão sendo eluídos por ordem crescente da sua afinidade para com a coluna, levando à sua separação que por sua vez fica registada num cromatograma sob

a forma de picos, saindo estes a um tempo específico denominado tempo de retenção (Bird, 1989).

Os polifenóis são compostos similares entre si e com uma elevada complexidade química, portanto, aquando da separação por um equipamento de HPLC, a sua eluição é comumente efetuada em gradiente. Nestes casos, a fase móvel consiste num sistema binário composto por um solvente polar e outro menos polar. É habitual o uso de acetonitrilo ou metanol como solventes menos polares e água ultrapura acidificada como solvente polar, tendo este último também a função de inibir a ionização de grupos fenólicos e carboxílicos, melhorando o tempo de retenção e a resolução (Haminiuk *et al.*, 2012). Aspectos como estes são fundamentais para que se possa manter uma elevada eficiência na capacidade de eluição e maior grau de separação de compostos, que se traduz num também elevado número de pratos teóricos. Porém, vários outros fatores, como a falta de qualidade da coluna cromatográfica e dos reagentes usados como fase móvel, podem também influenciar os resultados, levando a uma diminuição deste valor e à consequente obtenção de picos largos ou que co-eluem. Torna-se, assim, crucial a obtenção de um cromatograma com elevada resolução de modo a que a identificação e quantificação dos compostos a analisar seja inequívoca, procedendo-se sempre que possível à otimização dos diferentes passos inerentes a todo o processo (Bird, 1989), (Meyer and Wiley InterScience (Online service), 2010), (Zgórka and Kawka, 2001).

Outro aspeto importante a considerar durante o procedimento cromatográfico é a temperatura. Geralmente, um aumento da temperatura leva à diminuição da viscosidade do solvente, facilitando o seu efluxo e resultando numa eficiência mais elevada. Porém, temperaturas elevadas podem resultar na degradação dos compostos de interesse ou na evaporação do solvente em uso podendo resultar na formação de bolhas de ar que são prejudiciais para a fase estacionária e consequentemente podem comprometer os resultados obtidos (Meyer and Wiley InterScience (Online service), 2010), (Günzler and Williams, 2001).

Vários detetores estão disponíveis para a análise por HPLC, exemplos disso são o detetor de ultravioleta (UV), o detetor de *diode array* (DAD), o detetor de fluorescência (FLD) ou o detetor de eletroquímica (ECD) (Bird, 1989). O HPLC acoplado a um detetor DAD permite a identificação de compostos fenólicos através do varrimento dos espectros na região UV-visível, uma vez que é nestas regiões que os mesmos possuem absorvância máxima. O uso deste detetor permite uma análise de baixo custo, sensível e eficiente (Slovensko kemijsko društvo. and Trebše, 1993), (Haminiuk *et al.*, 2012). Vários estudos descrevem a quantificação de fenóis em diferentes frutos, nomeadamente em cerejas, utilizando este detetor (Gao and Mazza, 1995), (I. Marina Heinonen, Anne S. Meyer and Frankel, 1998). Contudo as características espectrais únicas de cada composto não são seletivas e podem variar entre estudos devido ao uso de diferentes fases móveis dificultando a identificação dos mesmos com base na literatura. Surge como alternativa o detetor de espectrometria de massa (MS), que é capaz de determinar o peso molecular dos componentes de uma matriz, permitindo

uma identificação mais precisa dos compostos. Porém, estes equipamentos são mais dispendiosos, limitando a sua utilização (Haminiuk *et al.*, 2012).

#### 1.2.4 Determinação da atividade antioxidante

A atividade antioxidante dos compostos fenólicos pode ser determinada segundo vários métodos. Os mais comuns na avaliação da atividade antioxidante são os testes químicos que se baseiam na transferência de átomos de hidrogênio ou na transferência de elétrons (Haminiuk *et al.*, 2012). Exemplos de testes baseados na transferência de átomos de hidrogênio são o ensaio de determinação do potencial antioxidante total (TRAP), que avalia a atividade antioxidante dos compostos fenólicos por avaliação da eliminação total de radicais, o ensaio com ácido 2,2'-azino-bis-3-etilbenzotiazolino-6-sulfônico (ABTS) e o ensaio de capacidade de absorção do radical de oxigênio (ORAC). Este último baseia-se na capacidade de inibição da peroxidação lipídica e é amplamente utilizado na medição da atividade antioxidante de fenóis presentes em frutos, permitindo a obtenção de resultados fiáveis, porém esta metodologia requer o uso de equipamentos muito dispendiosos (Joseph M. Awika *et al.*, 2003). Testes químicos que se baseiam na transferência de elétrons são o ensaio de capacidade antioxidante total equivalente ao Trolox (TEAC), o ensaio do poder antioxidante de redução do ferro (FRAP) e o ensaio com 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Este último é um dos métodos mais utilizados para avaliação da atividade antioxidante em extratos de frutos e baseia-se na eliminação do radical DPPH por um antioxidante, sendo esta eliminação manifestada pela alteração da cor roxa característica do DPPH para uma coloração amarela, acompanhada por uma diminuição da absorvância na gama dos 515-520 nm (Mishra, Ojha and Chaudhury, 2012).

Apesar da vasta utilização dos testes químicos na determinação da atividade antioxidante, estes apenas podem ser aplicados *in vitro*, sendo necessário a aplicação de um teste antioxidante celular quando os estudos são realizados *in vivo*. Uma das metodologias mais relevantes para ensaios realizados *in vivo* é o teste de atividade celular antioxidante (CAA), onde é utilizada uma sonda de 2',7'-diclorofluorescina que quando é reduzida por radicais peróxido emite fluorescência. Nesta técnica são considerados fatores como a absorção, metabolismo e localização dos compostos na célula, levando a uma ampla utilização deste tipo de metodologia na avaliação da atividade antioxidante em frutos (Haminiuk *et al.*, 2012).

#### 1.2.5 Compostos fenólicos no fruto de *Prunus avium* L.

O fruto de *Prunus avium* L., a cereja, é uma excelente fonte de fitoquímicos, nomeadamente compostos fenólicos (Ferretti *et al.*, 2010). Destes, o grupo mais predominante são os flavonoides (Figura 2), constituindo uma parte importante da dieta e sendo, por isso, o grupo

mais estudado (Del Rio *et al.*, 2010). Dentro dos flavonoides, destacam-se as antocianinas como o subgrupo mais relevante. Estes compostos são os responsáveis pela cor vermelha característica das cerejas, são compostos fotossensíveis e a temperaturas elevadas degradam-se facilmente (*Phenolic Compound Biochemistry*, 2006). Também propriedades sensoriais como aroma, adstringência e amargo são devidas a estes fenóis, que se encontram em maior quantidade na pele dos frutos (Ferretti *et al.*, 2010), (Wang *et al.*, 2017), (María Serrano *et al.*, 2005). A qualidade do fruto e o seu valor nutricional também está relacionado com a composição fenólica (María Serrano *et al.*, 2005).

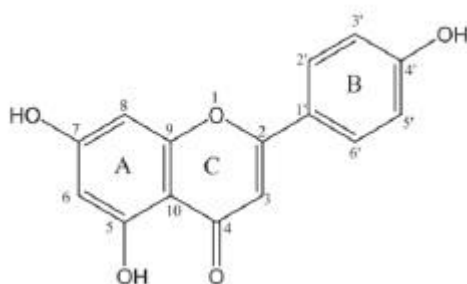


Figura 2- Estrutura química dos Flavonoides. Adaptado (*Phenolic Compound Biochemistry*, 2006)

Os polifenóis mais frequentemente encontrados em cerejas são o ácido clorogénico, ácido neoclorogénico, epicatequina, rutina, catequina, quercetina-3-O-rutinosídeo, ácido p-coumaroilquínico, cianidina-3- glicosídeo, cianidina-3-rutinosídeo, pelargonidina-3-glicosídeo, peonidina-3-rutinosídeo e peonidina-3-glicosídeo (Bastos *et al.*, 2015), (Grigoras *et al.*, 2012), (Slovensko kemijsko društvo. and Trebše, 1993), (Kelebek and Selli, 2011), (Ieri, Pinelli and Romani, 2012). Para além destes compostos, num estudo efetuado por Bastos *et al.* (Bastos *et al.*, 2015) foram também detetados outros. Os autores identificaram o ácido cis-3-p-cumaroilquinico (derivado de ácidos fenólicos), três antocianinas (cianidina-3-O-glucósido, cianidina 3-O-rutinósido e peonidina-3-O-rutinósido) e seis outros flavonoides (quercetina-O-desoxihexosilhexósido-O-hexósido, naringenina-O-hexósido, sakuranina, taxifolina, aromadendrina e taxifolina-O-desoxihexosilhexósido) (Bastos *et al.*, 2015). Assim, torna-se possível afirmar que tanto os diferentes compostos fenólicos como os seus níveis variam nos diferentes variedades de cerejas, sendo os fatores pré e pós-colheita também decisivos para a quantidade de compostos fenólicos neles presentes (Wang *et al.*, 2017).

O processo de amadurecimento, que se constata aquando da mudança de cor verde para uma tonalidade vermelha, está relacionado com a variação de compostos fenólicos. Em estágios iniciais, quando o fruto ainda está imaturo o conteúdo fenólico total e a quantidade de clorofila é maior. Até metade do processo de amadurecimento, os polifenóis vão diminuindo, aumentando depois numa fase mais tardia. Já a clorofila diminui progressivamente, enquanto que a quantidade de antocianinas aumenta (Ferretti *et al.*, 2010), (Redondo *et al.*, 2017), (María Serrano *et al.*, 2005). Serrano *et al.* (María Serrano *et al.*, 2005) realizaram um estudo onde se verificou que o peso e o tamanho do fruto de *Prunus avium L.* aumentam até uma

determinada fase do processo de amadurecimento, mantendo-se depois constante até às fases finais do mesmo. No mesmo estudo foi também possível verificar que no decorrer do mesmo processo a dureza da polpa vai diminuindo assim como a força necessária para remover a haste (María Serrano *et al.*, 2005).

Contudo, os níveis de compostos fenólicos podem ser afetados por vários fatores associados às condições climáticas e agronómicas denominadas fatores pré-colheita (Wang *et al.*, 2017), (Commisso *et al.*, 2017). A temperatura ambiental, intensidade da luz e o tipo de variedade são fatores cruciais que ditam a quantidade e a estabilidade dos polifenóis, afetando o valor nutricional das cerejas (Ferretti *et al.*, 2010), (McCune *et al.*, 2010). Estudos permitiram concluir que em ambientes com temperatura mais elevadas (25-30 °C) e maior exposição solar, as antocianinas e o restante conteúdo fenólico aumentam significativamente (Ferretti *et al.*, 2010), (McCune *et al.*, 2010). Também a composição do solo, o tipo de fertilização e o abastecimento de água e nutrientes necessários à planta interferem com a composição nutricional do fruto (Ferretti *et al.*, 2010). Estudos realizados em diferentes variedades de cerejas permitiram verificar que o conteúdo fenólico é diferente de variedade para variedade (Serra *et al.*, 2011). Outras condições que ditam os níveis de compostos fenólicos na cereja são os fatores pós-colheita, como é o caso das condições de armazenamento e de transporte (McCune *et al.*, 2010). Foi verificado que o conteúdo fenólico total neste fruto aumenta nos dias subsequentes à sua compra, uma vez que o processo de amadurecimento vai avançando, diminuindo a sua acidez e aumentando a intensidade da cor por consequência do aumento de antocianinas (Ferretti *et al.*, 2010). Estudos efetuados em diferentes variedades de cerejas comprovam também que quando ocorre irradiação pós-colheita com lâmpada UV-B o teor de antocianinas é significativamente maior do que em frutos irradiados com lâmpadas UV-A (Cherry, Sato and Arakawa, 1993). Gonçalves *et al.* (Berta Gonçalves *et al.*, 2004) efetuaram um estudo onde se verificou que os níveis de compostos fenólicos totais e de antocianinas em particular variam sob condições de armazenamento. Aquando de um armazenamento a 15 °C é possível verificar um aumento de antocianinas, por outro lado, se o armazenamento for efetuado a 2 °C os mesmos resultados não se verificam. Outros estudos relatam a comparação do conteúdo fenólico em cerejas frescas e após o seu processamento, tendo-se verificado que 75% das antocianinas se perderam após seis meses de armazenamento a -23 °C. Por outro lado, quando a cereja é armazenada a -70 °C a degradação de fenóis é menor (Chaovanalikit and Wrolstad, 2004). Ainda outro estudo realizado em frutas enlatadas, nomeadamente em cerejas, permitiu concluir que aqui existe pouca perda de fenóis no conteúdo total da lata, pois os polifenóis que se perdem no fruto ficam no sumo que nela se encontra (Kim and Padilla-Zakour, 2006).

As cerejas possuem inúmeros benefícios para a saúde relacionados com a sua composição fenólica. A sua atividade antioxidante tem sido amplamente estudada em diferentes tipologias de ensaios. Estudos realizados *in vivo* permitiram verificar que o consumo de cerejas leva a uma diminuição da peroxidação lipídica resultante da maior atividade de

enzimas antioxidantes (SOD e Gpx) (Ferretti *et al.*, 2010). Contudo o potencial antioxidante do fruto de *Prunus avium L.* não se encontra homogeneamente distribuído pelas diferentes partes do mesmo. Estudos comprovaram que esse potencial é maior na haste do que na polpa do fruto, levando a crer que isto se deve à maior concentração de fenóis também aqui localizada (Bastos *et al.*, 2015). A capacidade antioxidante também varia ao longo do desenvolvimento do fruto. Estudos relatam que a atividade antioxidante total acompanha a concentração de compostos fenólicos totais, pelo que no início do processo de desenvolvimento esta atividade diminui até metade deste mesmo processo, aumentando depois até ao final do mesmo (McCune *et al.*, 2010), (María Serrano *et al.*, 2005).

Benefícios relacionados com a diminuição da inflamação e do *stress* oxidativo também são atribuídos ao consumo de cerejas. Estudos permitiram verificar que a ingestão deste fruto diminui os níveis de proteína C reativa e óxido nítrico e inibem a atividade da cicloxigenase II (Cox II), levando a concluir que existe diminuição das vias inflamatórias (Kelley *et al.*, 2006), (Šarić *et al.*, 2009), (Haibo Wang *et al.*, 1999), (Mulabagal *et al.*, 2009). Ensaio *in vitro* com culturas celulares endoteliais, hepáticas, do cólon, da mama, leucémicas e de queratinócitos demonstraram que o consumo de cerejas leva a um aumento dos níveis de antocianinas conduzindo a efeitos anticancerígenos por estimulação da expressão de enzimas do metabolismo de fase II, inibição da mutagénese e indução da apoptose de modo a inibir a proliferação celular (Wang and Stoner, 2008). Estes e outros processos encontram-se esquematizados na figura 3.



Figura 3 -Efeitos dos compostos fenólicos e implicações em doenças crônicas. Adaptado (Ferretti *et al.*, 2010).

Para além dos estudos já referidos muitos outros têm sido realizados com o intuito de perceber qual o efeito dos diferentes constituintes fenólicos presentes nas cerejas ao nível da saúde, alguns deles encontram-se resumidos na tabela 2:

*Tabela 2- Efeitos benéficos para a saúde dos compostos fenólicos presentes em cerejas.*

<b>Polifenóis</b>	<b>Efeitos</b>	<b>Referência</b>
<b>Cianidina</b>	Inibição do crescimento tumoral; Diminuição doenças cardiovasculares; Retardamento do envelhecimento; Eliminação dos radicais livres O <sub>2</sub> <sup>••</sup> e NO; Inibição da clivagem do DNA; Indução de apoptose em células tumorais; Inibição do recetor do fator de crescimento epidérmico.	(Kong <i>et al.</i> , 2003), (Lila, 2004), (Seeram <i>et al.</i> , 2001), (Zhang, Vareed and Nair, 2005), (Piccolella <i>et al.</i> , 2008), (McCune <i>et al.</i> , 2010)
<b>Quercetina</b>	Atividade antioxidante e anticancerígena; Eliminação dos radicais livres O <sub>2</sub> <sup>••</sup> e NO; Diminuição de biomarcadores da peroxidação lipídica (malonildialdeído); Prevenção de dano oxidativo no DNA; Inibição da agregação plaquetária; Diminuição do risco de diabetes.	(Serra <i>et al.</i> , 2011), (McCune <i>et al.</i> , 2010)
<b>Rutina</b>	Atividade antioxidante e anticancerígena.	(Serra <i>et al.</i> , 2011)
<b>Catequina</b>	Atividade antioxidante e anticancerígena; Prevenção da oxidação da LDL; Eliminação dos radicais livres O <sub>2</sub> <sup>••</sup> e NO; Proteção antioxidante intracelular.	(Piccolella <i>et al.</i> , 2008), (Serra <i>et al.</i> , 2010)
<b>Epicatequina</b>	Atividade antioxidante e anticancerígena; Prevenção da oxidação da LDL; Eliminação dos radicais livres O <sub>2</sub> <sup>••</sup> e NO.	(Serra <i>et al.</i> , 2011), (Piccolella <i>et al.</i> , 2008)
<b>Ácido neoclorogéneo</b>	Atividade antioxidante e anticancerígena; Prevenção da oxidação da LDL;	(Serra <i>et al.</i> , 2011), (Piccolella <i>et al.</i> , 2008)

Eliminação dos radicais livres O <sub>2</sub> <sup>••</sup> e NO.		
<b>Ácido clorogénio</b>	Atividade antioxidante e anticancerígena; Prevenção da oxidação da LDL; Eliminação dos radicais livres O <sub>2</sub> <sup>••</sup> e NO;	(Serra <i>et al.</i> , 2011), (Piccolella <i>et al.</i> , 2008)
<b>Ácido p-cumaroilquinico</b>	Atividade antioxidante e anticancerígena; Eliminação do radical OH <sup>•</sup> .	(Serra <i>et al.</i> , 2011)
<b>Quercetina-3-glucósido</b>	Prevenção da oxidação da LDL.	(Serra <i>et al.</i> , 2011)
<b>Cianidina-3-glucósido</b>	Prevenção da oxidação da LDL; Inibição do stress oxidativo no tecido cardíaco; Diminuição da inflamação vascular.	(Serra <i>et al.</i> , 2011), (McCune <i>et al.</i> , 2010)
<b>Cianidina-3-O-β-D-glucósido</b>	Inibição da clivagem do DNA; Indução da apoptose em células tumorais; Redução da formação de placa arterosclerótica; Diminuição do colesterol e triglicéridos.	(McCune <i>et al.</i> , 2010)
<b>Pelargonidina-3 -rutinosido</b>	Prevenção da oxidação da LDL.	(Serra <i>et al.</i> , 2011)
<b>Peonidina-3-glucósido</b>	Prevenção da oxidação da LDL.	(Serra <i>et al.</i> , 2011)
<b>Peonidina-3-rutinosido</b>	Prevenção da oxidação da LDL.	(Serra <i>et al.</i> , 2011)
<b>Procianidina</b>	Redução do stress oxidativo; Redução da formação de placas β-amiloides em doentes com Alzheimer.	(McCune <i>et al.</i> , 2010)

Estudos epidemiológicos corroboram os efeitos anteriormente descritos, uma vez que revelaram uma correlação negativa entre indivíduos portadores de doenças crónicas como o cancro, inflamação crónica, doenças cardiovasculares e artrite, em indivíduos com dietas ricas em frutos e vegetais com quantidades abundantes de polifenóis (Lin and Tang, 2007).

### 1.3 Biodisponibilidade e bioacessibilidade

A biodisponibilidade e a bioacessibilidade são conceitos muitas vezes confundidos, no entanto, apesar de relacionados apresentam definições diferentes. Enquanto que a bioacessibilidade é a quantidade de composto que se liberta de uma matriz ficando disponível para ser absorvida após sofrer o processo de digestão, a biodisponibilidade consiste na quantidade de composto que atinge a circulação sistêmica e exerce o seu efeito depois de metabolizado e distribuído pelos tecidos (Carbonell-Capella *et al.*, 2014). Torna-se assim necessário garantir que os componentes de interesse de uma matriz alimentar sejam libertados da mesma de modo a ficarem disponíveis para serem absorvidos para a corrente sanguínea. De igual importância é conhecer os vários mecanismos pelos quais esses mesmos componentes atravessam o epitélio e alcançam a corrente sanguínea. Estão descritos quatro tipos de mecanismos de passagem pelo epitélio, como ilustrado na figura 4:

- 1- Difusão passiva através das membranas. É a via usada por moléculas lipofílicas e de baixo peso molecular, sendo também a mais frequente. Este processo segue a lei de Fick, que enuncia que a taxa de absorção é proporcional à concentração de determinada substância e à área da superfície, podendo a absorção para a mesma substância variar consoante a composição lipídica e proteica da membrana (Barthe, Woodley and Houin, 1999), (Shah *et al.*, 2006).
- 2- Transporte mediado. É um mecanismo utilizado por pequenas moléculas hidrofílicas. Envolve proteínas transmembranares que cumprem a função de transportadores podendo ocorrer a saturação dos mesmos. Este processo pode ocorrer de forma ativa, quando ocorre gasto de energia, ou passiva, quando o transporte ocorre em função do gradiente de concentração (Barthe, Woodley and Houin, 1999), (Shah *et al.*, 2006).
- 3- Endocitose. É um mecanismo que ocorre com gasto de energia e de forma lenta, sendo muito usual para a absorção de grandes péptidos e outras macromoléculas. Consiste na formação de vesículas endocíticas, que podem ou não ter recetores específicos, e vão invaginar os compostos de interesse (Barthe, Woodley and Houin, 1999), (Shah *et al.*, 2006).
- 4- Transporte paracelular. Consiste na absorção de substâncias através das junções entre as células. É uma via usada principalmente por pequenas moléculas hidrofílicas, contudo não é amplamente utilizada, uma vez que as junções apenas representam 0.1% da superfície de intestino (Barthe, Woodley and Houin, 1999), (Shah *et al.*, 2006).

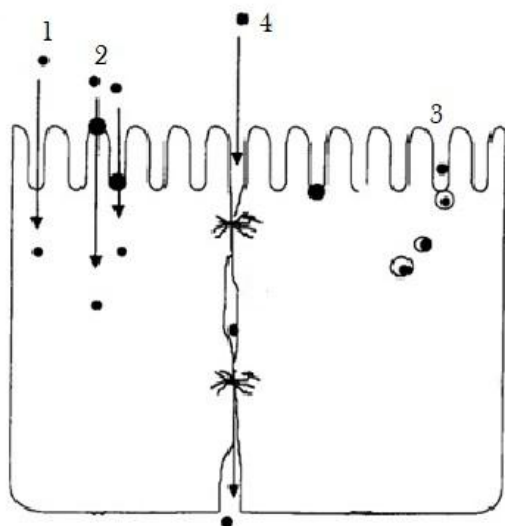


Figura 4- Mecanismos de passagem celular. Adaptado (Barthe, Woodley and Houin, 1999)

A absorção de substâncias no intestino por qualquer um dos mecanismos anteriores está condicionada por vários fatores. As propriedades químicas como a solubilidade, estereoquímica, peso molecular, pKa e carga são alguns desses fatores (Barthe, Woodley and Houin, 1999), (Devkar *et al.*, 2015). Porém, ainda outras variantes relacionadas com as propriedades do trato gastrointestinal como o pH do mesmo, esvaziamento gástrico, trânsito intestinal, eliminação pré-sistêmica e interações com o muco têm influência na absorção. De realçar que no caso da eliminação pré-sistêmica ocorre uma diminuição da quantidade de composto que atinge a circulação não porque é pouco absorvido, mas sim porque já foi eliminado anteriormente no lúmen gastrointestinal (Barthe, Woodley and Houin, 1999). O muco, que consiste numa substância viscosa que reveste a superfície epitelial do trato gastrointestinal protegendo a mucosa de danos mecânicos e evitando o esgotamento de água garantindo a lubrificação para facilitar o trânsito gastrointestinal, influencia a absorção de algumas substâncias devido à formação de ligações iônicas que vão retardar o processo. Para além das variantes já referidas, as células epiteliais do intestino, sobretudo no delgado, possuem uma proteína transmembranar, a glicoproteína-P, que bombeia para o exterior vários tipos de xenobióticos por um processo dependente de energia. Isto dificulta a absorção de algumas substâncias, porém o mesmo processo é o responsável por uma multirresistência a células tumorais (Barthe, Woodley and Houin, 1999).

No caso particular dos compostos fenólicos o consumo de frutos com maior teor dos mesmos não é sinónimo de maiores concentrações destes compostos na corrente sanguínea, isto porque a biodisponibilidade varia amplamente entre os diferentes fenóis, fontes alimentares e o grau de maturação do fruto em que estes compostos se encontram (Ferretti *et al.*, 2010), (Haminiuk *et al.*, 2012). Vários são os fatores que interferem com a libertação e absorção dos fenóis presentes em frutas (Haminiuk *et al.*, 2012). Um dos fatores mais relevantes são as

frequentes interações dos polifenóis, ainda nas matrizes alimentares, com diferentes macromoléculas como é o caso das proteínas e fibras. As interações destes compostos com fibras podem reduzir a bioacessibilidade e conseqüentemente a biodisponibilidade no intestino delgado, porém quando atingem o intestino grosso permanecem no lúmen exercendo a sua função antioxidante e contribuindo para um ambiente saudável (Haminiuk *et al.*, 2012). Os polifenóis interagem também com açúcares, encontrando-se frequentemente na forma glicosilada e influenciando a absorção e o local onde esta ocorre, uma vez que os compostos fenólicos glicosilados, na forma polimérica ou de ésteres são hidrolisados enzimaticamente e depois absorvidos no intestino grosso, enquanto que as agliconas são absorvidas diretamente no intestino delgado (Ferretti *et al.*, 2010), (Haminiuk *et al.*, 2012). Pode inferir-se ainda que o tipo de glúcido e o grau de glicosilação bem como a acilação afetam a taxa e a extensão da absorção no intestino (Haminiuk *et al.*, 2012). Variações genéticas entre indivíduos, a diferente composição microbiótica e patologias também podem influenciar a absorção (Ferretti *et al.*, 2010) (Somoza *et al.*, 2015), (Barthe, Woodley and Houin, 1999). O processamento de frutos a nível industrial também possui um papel importante na biodisponibilidade dos compostos fenólicos, uma vez que o conteúdo fenólico fica alterado em termos de estrutura e de quantidade (Haminiuk *et al.*, 2012). Estudos realizados em maçãs, pêssegos e uvas permitiram concluir que o conteúdo fenólico se encontra maioritariamente na casca, assim, em sumos de fruta produzidos ao nível industrial, onde é retirada a casca do fruto, o nível de polifenóis fica reduzido (Kelly Wolfe, Xianzhong Wu and Rui Hai Liu, 2003), (King, Bomser and Min, 2006), (Andreotti *et al.*, 2008). Outros procedimentos como a maceração ou a fermentação também influenciam a biodisponibilidade dos polifenóis. Estudos realizados em vinhos levam a crer que a presença de etanol nos mesmos contribui para a biodisponibilidade por alteração da estrutura dos compostos fenólicos ou pela transformação destas em novas estruturas (Duthie *et al.*, 1988), (Rodrigo, Miranda and Vergara, 2011). Outra das variantes mais relevantes para a biodisponibilidade é a interação ao nível biológico entre polifenóis e células, enzimas, recetores, transportadores, microflora intestinal ou proteínas do organismo (Somoza *et al.*, 2015), (Haminiuk *et al.*, 2012). Muitos compostos fenólicos presentes em frutos apenas se tornam bioacessíveis e biodisponíveis depois de sofrerem estas interações (Haminiuk *et al.*, 2012). Cerca de 48% dos fenóis de matrizes alimentares ficam bioacessíveis no intestino delgado sendo sensivelmente menor (42%) no intestino grosso. Depois da absorção estes compostos são metabolizados por ação de várias enzimas. Uma das primeiras etapas do metabolismo é a remoção de eventuais açúcares efetuada por  $\beta$ -glucosidases ou o transporte direto para o interior das células epiteliais por transportadores de glucose, no caso de não estarem presentes açúcares os polifenóis podem ser conjugados no intestino delgado e, posteriormente, no fígado por processos de metilação, sulfatação ou glucuronidação. Estas reações de conjugação em compostos fenólicos são catalisadas por enzimas como a  $\beta$ -glucosidase citosólica (CBG) e a lactase de floridizina hidrolase (LPH) que estão presentes no epitélio intestinal, por sua vez, ao nível dos restantes tecidos as enzimas responsáveis por estas reações são a catecol-O-

metiltransferase (COMT), a UDP glucuronosil transferase (UDPGT) e a fenol sulfotransferase (P-PST). Alguns compostos fenólicos metabolizados aquando da absorção associam-se a proteínas séricas que facilitam o seu transporte pela corrente sanguínea até atingirem os tecidos onde exercem as suas atividades biológicas (Somoza *et al.*, 2015), (Acosta-Estrada, Gutiérrez-Urbe and Serna-Saldívar, 2014), (Crozier, Del Rio and Clifford, 2010), (Haminiuk *et al.*, 2012). Os restantes polifenóis que não são absorvidos no intestino delgado migram para o intestino grosso onde podem ser metabolizados pela microflora intestinal. Aqui os glucósidos são hidrolisados em agliconas e ácidos fenólicos, enquanto que os ácidos hidroxicinâmicos esterificados carecem da ação das esterases da microflora de modo a clivarem as ligações éster. Outros compostos, como o ácido clorogénico, dependem da ação de enzimas presentes na microflora do cólon para poderem ser metabolizados (Haminiuk *et al.*, 2012).

### 1.3.1 Determinação da biodisponibilidade

A determinação da biodisponibilidade de um determinado composto é um processo difícil e implica a obtenção de resultados relativos à sua absorção, metabolismo, distribuição pelos tecidos e excreção (Gordon J. McDougall *et al.*, 2005), (Versantvoort *et al.*, 2005). A biodisponibilidade pode ser determinada com recurso a metodologias *in vivo*, *in situ* ou *in vitro* (Barthe, Woodley and Houin, 1999). Os ensaios considerados mais eficazes são os que usam modelos *in vivo*. Este tipo de ensaios, realizados em animais ou humanos, permitem determinar a biodisponibilidade por quantificação dos analitos presentes em amostras biológicas como urina ou sangue (Kalt *et al.*, 2014). Contudo a realização destes ensaios levanta questões éticas e, em humanos, torna-se impossível o controlo de todos os fatores que podem interferir com os possíveis resultados. Aquando do uso de animais esses fatores podem ser controlados, uma vez que se torna possível restringir a dieta por mais tempo, permitindo a obtenção de resultados mais fidedignos (Kalt *et al.*, 2014). Outros ensaios possíveis de se realizar são as experiências *in situ*. Estes ensaios consistem na perfusão de segmentos do intestino de animais anestesiados com uma solução que contém o composto de interesse, procedendo-se posteriormente à quantificação desse mesmo composto. Nestas experiências variáveis que afetam a absorção do analito como pH, concentração, osmolaridade, taxa de fluxo e região intestinal podem ser controladas. Apesar de não serem considerados ensaios *in vivo*, este tipo de experimentação também realizada em animais aproxima-se muito aos mesmos, tirando proveito da irrigação, inervação e depuração do sangue do animal (Barthe, Woodley and Houin, 1999). Porém, os ensaios *in situ* requerem a utilização de um elevado número de animais, sendo considerados pouco éticos. Além disso, a anestesia administrada aos animais, bem como a manipulação cirúrgica diminuem o fluxo intestinal e alteram o fluxo sanguíneo nos intestinos podendo afetar a absorção intestinal (Yuasa, Matsuda and Watanabe, 1993).

Nos últimos anos têm surgido várias técnicas *in vitro* que permitem avaliar a biodisponibilidade de determinados compostos de forma fidedigna. Exemplo disso é a utilização cada vez maior de câmaras de Ussing. Esta metodologia consiste na colocação de pequenas secções da mucosa intestinal entre duas câmaras que contêm tampão, a um dos compartimentos adiciona-se o composto de interesse passando este a denominar-se de câmara dadora. Seguidamente é efetuada uma medição em função do tempo da acumulação do composto no outro compartimento, denominando-se este de câmara recetora. A grande desvantagem desta técnica é a utilização de tampões salinos de incubação que inviabilizam o tecido (Barthe, Woodley and Houin, 1999). Estudos histológicos demonstraram que o epitélio normal da mucosa intestinal fica comprometido após 30 minutos de incubação com tampão salino e após 1 hora ocorre rutura total do epitélio (Walsh and Levine, 1979). Um outro método que tem vindo a ser utilizado é a técnica do saco intestinal evertido. É uma metodologia simples, rápida e barata onde uma porção de intestino previamente lavado com uma solução salina é colocada em meio de cultura e é suavemente evertido. Depois deste processo o intestino é cortado em porções mais pequenas, preenchido com meio de cultura e suturado com fio de seda de modo a formar pequenos sacos. Estes sacos de intestino podem depois ser incubados com uma solução que contenha o composto de interesse, sendo depois determinada a quantidade do mesmo que foi absorvida para o interior do saco. Porém, apesar de fornecer informações sobre os mecanismos de absorção intestinal, nem sempre os resultados obtidos refletem a absorção real em humanos, uma vez que é utilizado um modelo animal. Outro aspeto menos positivo é o facto de o saco ser um compartimento fechado, o que distorce a cinética de absorção (Barthe, Woodley and Houin, 1999).

A utilização de técnicas *in vitro* associadas a digestões simuladas tem vindo a aumentar no decorrer dos anos. Grande parte dos modelos que usam a digestão *in vitro* simulam de uma forma mais simples o processo digestivo na boca, estômago, intestino delgado, e em alguns casos a fermentação intestinal, para que estudos acerca de biodisponibilidade possam ser efetuados de forma mais viável (Versantvoort *et al.*, 2005), (Minekus *et al.*, 2014). Estes procedimentos têm como objetivo simular as condições fisiológicas, tendo em conta fatores como as enzimas digestivas, pH, tempo de digestão e concentrações salinas (Minekus *et al.*, 2014). As técnicas com membranas artificiais permeáveis têm sido amplamente aplicadas na área alimentar, permitindo estudar a passagem de compostos de interesse por difusão passiva. Esta metodologia consiste na colocação da matriz, digerida *in vitro*, em contacto com tubos que contêm membranas de celulose, funcionando estas como um filtro que só permite a passagem de compostos com 12 kDa. Posteriormente procede-se à quantificação por extrapolação (Miller *et al.*, 1981). Contudo, as técnicas *in vitro* que impulsionaram os estudos de biodisponibilidade utilizam modelos celulares que imitam as condições do intestino delgado. As culturas primárias de células do intestino têm pouca viabilidade, uma vez que não possuem a capacidade de formar uma monocamada organizada (Barthe, Woodley and Houin, 1999). Assim, os modelos celulares que mais frequentemente são utilizados obtêm-se a partir

de linhas celulares imortalizadas que provêm de tecidos tumorais quimicamente induzidos ou de carcinomas do cólon e têm capacidades proliferativas em cultura celular de modo espontâneo ou induzido. As células HT-29, que têm origem num adenocarcinoma humano, são exemplo disso. Esta linhagem celular não tem capacidade de diferenciação espontânea em meio de cultura celular, porém o seu crescimento pode ser induzido por determinados fatores químicos que se podem acrescentar ou substituir nesse mesmo meio. Outra linha celular utilizada são as células T84 que derivam de um carcinoma intestinal humano. Esta linhagem diferencia-se espontaneamente em meio de cultura celular após atingir confluência, porém estas células não expressam marcadores de diferenciação bioquímica ou morfológica, não sendo um modelo muito útil no estudo da absorção de determinados compostos (Barthe, Woodley and Houin, 1999). A linha celular mais utilizada em estudos de biodisponibilidade são as Caco-2, que derivam de um carcinoma do cólon humano (Sambuy *et al.*, 2005). Estas células são morfológicamente semelhantes às células que constituem o intestino delgado, uma vez que apresentam um aspeto de escova na face apical, expressando hidrolases idênticas às do intestino delgado e também junções intercelulares estreitas. Outras enzimas expressas por esta linha celular são a glutathione-S-transferase, sulfotransferase e glucuronidase que efetuam a detoxificação de fase I e de fase II, o que torna frequente o uso desta linhagem em estudos sobre o metabolismo de determinados compostos (Barthe, Woodley and Houin, 1999), (Kosińska-Cagnazzo *et al.*, 2015). As células Caco-2 são cultivadas em monocamada, diferenciando-se espontaneamente em enterócitos, o que torna possível a realização de estudos sobre a absorção de compostos de interesse (Barthe, Woodley and Houin, 1999), (Kosińska-Cagnazzo *et al.*, 2015). Aquando da realização desses mesmos estudos é comum o uso de placas com *inserts* que contêm uma membrana porosa. Assim, cada poço fica com um compartimento apical (superior), que simula o lúmen intestinal e um compartimento basolateral (inferior), que representa a corrente sanguínea. Estes compartimentos ficam separados por uma membrana porosa onde as células ficam aderidas, tal como ilustrado na figura 5. Este modelo experimental permite o estudo simultâneo dos principais mecanismos de transporte no intestino (Barthe, Woodley and Houin, 1999), (Devkar *et al.*, 2015). É possível inferir que a utilização de células Caco-2 é vantajosa para estudos de biodisponibilidade, sendo a sua principal vantagem o facto de derivarem de uma linha celular humana, não havendo diferenças interespecies em termos de morfologia e fisiologia. Além disso, os métodos onde elas se aplicam não requerem o uso de animais, ao contrário de alguns modelos *in vitro* acima referido. Contudo, esta linhagem celular advém de um carcinoma, podendo possuir eventuais propriedades diferentes das células ditas normais. Outra desvantagem da utilização das células Caco-2 é o tempo de preparação das mesmas desde que se semeiam até que estão aptas para serem utilizadas, uma vez que podem demorar semanas a atingir a confluência. Por fim, a maior desvantagem desta linha celular é o facto de as taxas de absorção serem lentas (Barthe, Woodley and Houin, 1999). Deste modo, é necessário algum cuidado na extrapolação de resultados, pois embora esta linha celular seja uma poderosa ferramenta para o estudo da biodisponibilidade *in vitro*, uma vez que tem

características muito semelhantes ao epitélio intestinal, não retrata exatamente as condições *in vivo* (Verhoeckx *et al.*, 2015).

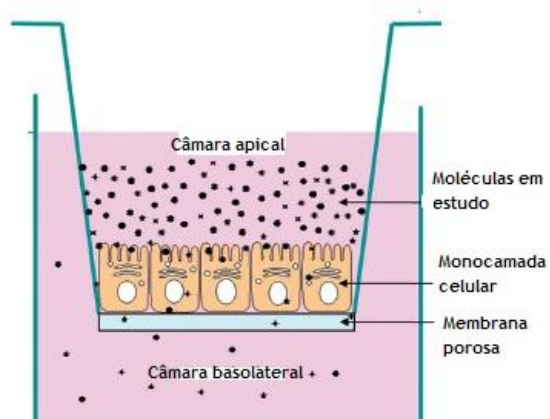


Figura 5-Modelo utilizado em estudos de biodisponibilidade com Caco-2. Adaptado (Devkar *et al.*, 2015)

## 2. Objetivos

O fruto de *Prunus avium L.*, e em específico o seu conteúdo fenólico, tem despertado um grande interesse na comunidade científica pelas suas propriedades e benefícios para a saúde. Contudo, estudos sobre a biodisponibilidade e bioacessibilidade destes mesmos compostos em cerejas até à atualidade não foram efetuados. Dado os benefícios já apresentados é crucial ter-se conhecimento do percurso dos polifenóis no organismo de modo a que se tenha conhecimento quando e em que condições estes se libertam do fruto e se são capazes de aceder à corrente sanguínea para exercer os seus efeitos.

Assim, o presente trabalho tem por objetivo avaliar a bioacessibilidade dos compostos fenólicos presentes em cerejas (variedade *Saco*), antes e depois do processo de digestão *in vitro*, tendo-se para isso utilizado uma linha celular derivada do tumor gastrointestinal (Caco-2). Pretende-se ainda caracterizar e quantificar estes compostos fenólicos e ainda avaliar a sua atividade antioxidante.



## 3. Materiais e métodos

### 3.1 Materiais

#### 3.1.1 Compostos, soluções e meios de cultura

- Acetonitrilo (Carlo Erba, Itália), grau-HPLC
- Ácido clorídrico 37% (HCl), grau analítico
- Ácido glucorónico (Sigma Aldrich, Portugal)
- Ácido trifluoroacético 0,1% (Sigma Aldrich, Portugal), grau-HPLC
- Albumina de soro bovino (BSA) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Alfa-amilase (Sigma Aldrich, Portugal)
- Azul de tripano (Sigma Aldrich, Portugal)
- Bicarbonato de sódio (NaHCO<sub>3</sub>) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Bile (Sigma Aldrich, Portugal)
- Brometo de 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio (MTT) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Cloreto de cálcio dihidratado (CaCl<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Cloreto de magnésio (MgCl<sub>2</sub>) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Cloreto de potássio (KCl) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Cloreto de sódio (NaCl) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Coluna cromatográfica Eclipse Plus C18 Agilent Technologies (Soquímica, Portugal)
- Dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Etanol 70%
- Fosfato de potássio monobásico (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Fosfato de sódio monobásico (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Glucose (Sigma Aldrich, Portugal)
- Hidróxido de Sódio (NaOH) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Lipase (Sigma Aldrich, Portugal)
- Lucifer yellow (Sigma Aldrich, Portugal)
- Metanol (Fisher Scientific, Reino Unido), grau analítico
- Mistura de antibióticos e antimicótico (penicilina, streptomina e anfotericina B) (Sigma Aldrich, Inc.)
- Mucina (Sigma Aldrich, Portugal)

- Padrões analíticos de cianidina, quercetina-3,4-di-O-glicosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo, quercetina, ácido gálico, ácido p-coumárico, rutina, epicatequina e ácido clorogénico (Sigma-Aldrich, Portugal e Extrasynthesis, França)
- Pancreatina (Sigma aldrich, Portugal)
- Pepsina (Sigma aldrich, Portugal)
- Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium completo (RPMI-C) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium incompleto (RPMI-I) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium completo sem fenol red (RPMI-C) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Roswell Park Memorial Institute 1640 Medium incompleto sem fenol red (RPMI-I) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Solução salina equilibrada de Hank (HBSS) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Soro fetal de bovino (FBS) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Sulfato de sódio ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Tampão fosfato salino (PBS) 1X
- Tiocianato de potássio (KSCN) (Sigma Aldrich, Portugal)
- Tripsina (Sigma Aldrich, Portugal)
- Ureia (Sigma Aldrich, Portugal)

### 3.1.2 Equipamentos

- Banho termostatzado P-Selecta Unitronic-OR
- Câmara de fluxo laminar NUAIRE Class II
- Centrífuga Beckman Coulter, Allegra X22R
- Centrífuga Hettich, Mikro 200R
- Centrífuga Sigma 3K18C Bioblockscientific
- Estufa NUAIRE DHD Autoflow CO2 Air-Jacketed incubator
- Evaporador rotativo Rotavapor R-215, Buchi Switzerland
- Espectrofluorímetro Spectra Max Gemini EM
- Hemocitómetro ou câmara de Neubauer
- Leitor espectrofotométrico de microplacas EZ Read 400
- Liofilizador Savant, Novalyphe-NL500
- Medidor de resistência transepitelial (Millicell ERS-2)
- Microscópio ótico composto Olympus CK40
- Sonicador Transsonic 460/H, Elma

- Sistema de HPLC-DAD, modelo 1290 da Agilent Technologies (Soquímica, Portugal)

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Preparação das amostras de cerejas

#### 3.2.1.1 Liofilização do fruto

Neste trabalho foi utilizada a variedade *Saco* de cereja da região do Fundão da colheita correspondente ao ano de 2017 que foram gentilmente cedidas pela “Cerfundão-Embalamento e comercialização de cerejas da Cova da Beira, Lda.”. Após colhidos os frutos foram processados de imediato. Pesaram-se 200 g de cereja e procedeu-se ao seu congelamento a -80 °C durante 24 horas. Este processo garantiu que todas as moléculas de água se encontravam no estado sólido, passando diretamente para o estado gasoso durante o processo de liofilização realizado durante 60 horas. A liofilização foi dada como concluída após se verificar a perda quase total de água no fruto.

#### 3.2.1.2 Extração a partir do fruto liofilizado

O processo de extração direcionada para compostos fenólicos foi realizado a partir da cereja liofilizada. Por cada grama de fruto liofilizado utilizaram-se 20 mL de metanol acidificado com 0,1 % de HCl. A utilização desta mistura permite aumentar o rendimento de extração das antocianinas e antocianidinas. Esta mistura foi depois colocada num banho termostatizado a 35 °C sob agitação durante 2 horas a 64 rpm. O processo de extração foi repetido duas vezes. Posteriormente separou-se o extracto do resíduo por centrifugação a 4000 rpm durante 20 minutos.

Após este passo, o solvente foi evaporado no rotavapor a 35 °C e 130 mbar, de modo a diminuir a probabilidade de degradação de antocianinas e antocianidinas, até à obtenção de um produto com uma textura viscosa, similar a caramelo, cor de cereja. Seguidamente, o extrato obtido foi conservado a 4 °C e protegido da luz até à sua utilização.

O rendimento de extração foi determinado com base na seguinte equação:

$$\eta = \frac{m \text{ extrato}}{m \text{ fruta liofilizada}} \times 100$$

### 3.2.2 Digestão *in vitro*

A metodologia utilizada para a digestão simulada *in vitro* é a descrita na literatura por Versantvoort *et al.* (Versantvoort *et al.*, 2005) com algumas modificações.

Foram pesados os reagentes indicados na tabela 3 para um volume final de 50 mL, de modo a preparar as soluções que simulam o efeito dos fluidos salivar, gástrico, duodenal e biliar. Posteriormente estes foram conservados nas devidas condições de armazenamento, e antes da realização da experiência o pH de cada solução foi acertado para o indicado na tabela 3.

Tabela 3-Quantidades pesadas para a preparação das soluções que simulam os fluidos da digestão *in vitro*. Adaptado (Versantvoort *et al.*, 2005).

	Saliva		Gástrico		Duodenal		Biliar	
	Reagente	Quantidade (mg)	Reagente	Quantidade (mg)	Reagente	Quantidade (mg)	Reagente	Quantidade (mg)
Inorgânico	KCl	44,8	NaCl	138	NaCl	350,6	NaCl	262,95
	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	44,4	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	13,32	NaHCO <sub>3</sub>	169	NaHCO <sub>3</sub>	289,2
	NaSO <sub>4</sub>	28,5	KCl	41,22	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4	KCl	18,82
	NaCl	14,9	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	19,98	KCl	28,22	HCl 37%	7,5 µL
	NaHCO <sub>3</sub>	84,7	NH <sub>4</sub> Cl	15,3	MgCl <sub>2</sub>	27 µL		
			HCl 37%	325 µL	HCl 37%	9 µL		
Orgânico	Ureia	10	Glucose	32,5	Ureia	5	Ureia	12,5
			Ureia	4,25				
Enzimático	α-amilase	14,5	BSA	50	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	9,99	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	11,1
	Mucina	1,25	Pepsina	125	BSA	50	BSA	90
	Ácido Úrico	0,75	Mucina	150	Pancreatina	450	Bile	1500
					Lipase	75		
pH	6,8		1,3		8,1		8,2	

Pesaram-se 4,5 g do extrato viscoso com cor de cereja obtido anteriormente e adicionaram-se 6 mL do fluido salivar simulado, sendo esta mistura colocada em banho termostatizado a 37°C durante 5 minutos, com agitação orbital. Ao fim deste tempo recolheu-se uma alíquota para posterior análise. Seguidamente adicionaram-se 12 mL de fluido gástrico incubando-se durante 2 horas nas mesmas condições. Findo este tempo foi recolhida uma alíquota para posterior análise. De seguida, adicionou-se à mistura anterior 12 mL de fluido duodenal, 6 mL

de fluido biliar e 2 mL de solução de bicarbonato de sódio 1 M, mantendo-se as condições a cima descritas. Ao fim do tempo referido retirou-se outra alíquota para análise.

Todas as alíquotas retiradas foram imediatamente colocadas em gelo após a recolha e seguidamente foram congeladas a -80 °C durante 30 minutos de modo a parar a atividade enzimática. Depois foram protegidas da luz e conservadas a -4°C até à sua utilização.

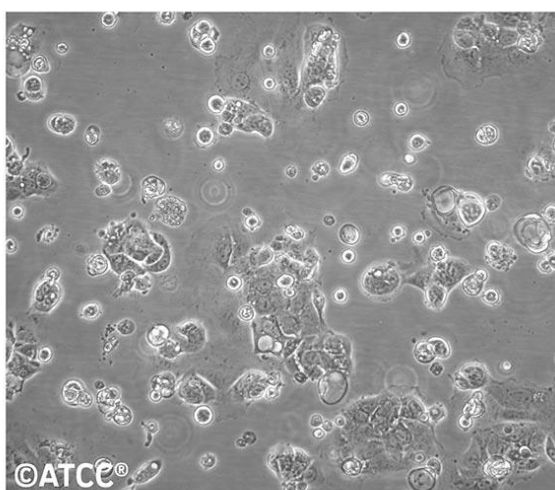
### 3.2.3 Linhas Celulares

#### 3.2.3.1 Caco-2

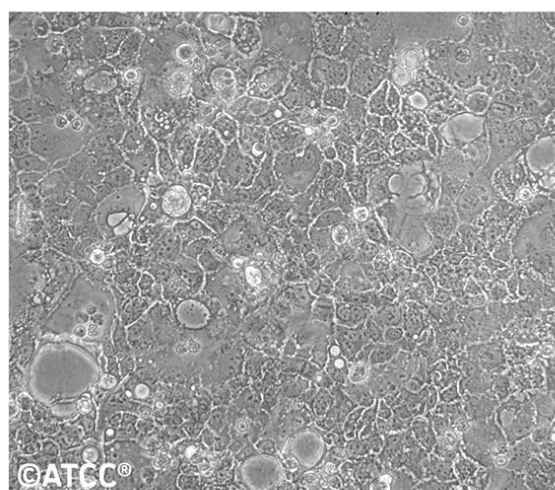
A linha celular Caco-2 foi instituída em 1970 a partir de um tumor gastrointestinal humano, mantendo as características morfológicas e biológicas dos enterócitos que constituem o intestino delgado. As características morfológicas destas células podem ser afetadas pelo número de passagens bem como pelo pH e composição do meio. O número de passagens é crucial não só para a morfologia, mas também para a taxa de proliferação, densidade celular e atividade metabólica. Por outro lado, o pH e a composição, do meio podem interferir com a proliferação, diferenciação, permeabilidade e motilidade das células (Sambuy *et al.*, 2005).

Neste estudo, as células Caco-2 foram utilizadas entre as passagens 30 e 34 e mantidas em meio RPMI-C (meio RPMI suplementado com 10% de FBS e 1% de mistura de antibióticos).

Designation: Caco-2



Low Density



High Density

Figura 6- Morfologia das células Caco-2 ao microscópio ótico composto em baixa e alta confluência (ATCC, 2018).

### 3.2.3.2 Manutenção das culturas celulares e da área de trabalho

Antes de se dar início ao trabalho na câmara de fluxo laminar deve garantir-se a esterilização da mesma. Para isso a lâmpada UV foi ligada nos 15 minutos anteriores à sua utilização. De seguida o fluxo vertical e a luz interior foram ligados e o vidro subido até ao limite indicado. Decorridos aproximadamente 5 minutos, procedeu-se à limpeza do interior da câmara borrifando toda a superfície com etanol 70%.

#### 3.2.3.2.1 Caracterização e preparação dos meios de cultura

A composição dos meios de cultura é imperativa para o crescimento e manutenção das culturas celulares. Esta varia consoante a linha celular em uso, uma vez que cada tipo de células tem as suas características. Fazem parte dos constituintes básicos de um meio de cultura: água, sais inorgânicos, hidratos de carbono, vitaminas, aminoácidos, lípidos e suplementos em concentrações variáveis, podendo também ser adicionados, caso haja necessidade, sistemas tampão e indicadores de pH. Os meios de cultura podem ainda ser suplementados com FBS que contém fatores de crescimento, fatores de adesão celular, albumina, anti-proteases e transportadores do ião  $Fe^{3+}$ , entre outros constituintes, imprescindíveis ao crescimento celular.

No presente estudo, o meio de cultura utilizado foi RPMI-C, cuja suplementação já foi descrita anteriormente.

#### 3.2.3.2.2 Descongelamento e contagem

As células foram retiradas do azoto líquido, descongeladas à temperatura ambiente e imediatamente colocadas num tubo de 15 mL que continha 5 mL de meio de cultura previamente aquecido em banho a 37 °C. Em seguida, a suspensão foi centrifugada a 1200 rotações por minuto durante 4 minutos, após a qual, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspenso em meio de cultura. Foi efetuada a contagem de células, tendo-se retirado 10 µL da suspensão anterior para um *ependorf* ao qual se adicionaram 10 µL de azul de tripano. Seguidamente, ressuspenso-se a mistura presente no *ependorf* e pipetaram-se 10 µL desta para uma câmara de Neubauer (figura 7), procedendo-se à contagem do número de células viáveis num microscópio ótico composto em cada um dos quatro quadrantes. Uma vez que o azul de tripano é um corante, apenas as células não viáveis o incorporam pois têm a membrana danificada, por outro lado, as células viáveis apresentam uma tonalidade mais clara e brilhante. Para determinar a concentração de células aplicou-se a seguinte fórmula:

$$n^{\circ} \text{ de células/mL} = \text{média das células nos quadrantes} \times 10^4 \times 2$$

Posteriormente, foi transferido para um frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup> o volume equivalente a 1x10<sup>6</sup> células, perfazendo-se um volume total de 5 mL com meio de cultura. O frasco foi devidamente identificado com a designação da linha celular, número de passagem da cultura, acrónimo do utilizador e data.

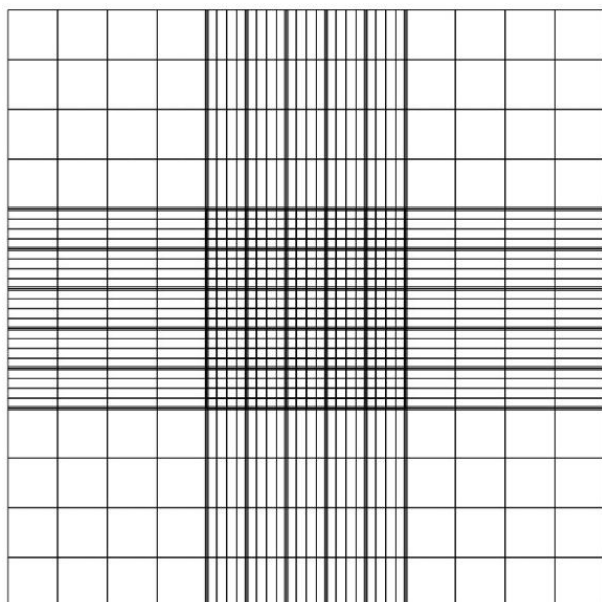


Figura 7- Aspeto da câmara de Neubauer (hemocitômetro) sob um microscópio óptico.

### 3.2.3.2.3 Tripsinização

A tripsinização é um procedimento que recorre à utilização de tripsina de modo a dissociar as células aderentes em crescimento do material de plástico onde se encontram em cultura. Este procedimento foi aplicado sempre que as células atingiam cerca 90% de confluência. Para tal, aspirou-se o meio dos frascos de cultura onde se encontravam as células em crescimento e lavou-se com PBS 1X adicionando-o ao frasco de cultura e fazendo movimentos circulares suaves de modo a que este passasse sobre as células. Seguidamente, aspirou-se o PBS 1X e adicionou-se tripsina-EDTA 0,25 % (2 mL por frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup>, 4 mL por frasco de cultura de 75 cm<sup>2</sup> e 8 mL por frasco de cultura de 175 cm<sup>2</sup>) deixando-a atuar aproximadamente durante 5 min, na estufa a 37 °C. Decorrido este tempo auxiliou-se o processo de dissociação através de ligeiras pancadas secas nos frascos de cultura.

Assim que as células deixaram de estar aderidas ao frasco de cultura, adicionou-se o dobro do volume de meio de cultura de modo a cessar a reação da tripsina. Esta suspensão foi aspirada, colocada num tubo de 15 ou 50 mL e centrifugada a 1200 rotações por minuto durante 4 minutos. Decorrido este processo o sobrenadante foi descartado e o *pellet*

ressuspendido em 1 mL de meio de cultura. A suspensão foi depois transferida para um frasco de cultura previamente identificado (como já indicado anteriormente), cujo tamanho vai aumentando sucessivamente.

Aquando da tripsinização das células para placas de 12 poços, o processo foi ligeiramente diferente. Em cada poço foram previamente colocados *inserts* de modo a criar a câmara apical (superior) e a basolateral (inferior), a membrana dos mesmos foi previamente humedecida com meio de cultura e foram adicionadas  $6 \times 10^4$  células no compartimento superior, perfazendo um volume final de 500  $\mu$ L. No compartimento inferior colocou-se um volume de meio de cultura de 1,5 mL.

#### **3.2.3.2.4 Criopreservação**

Ao longo deste trabalho a criopreservação de células foi efetuada duas vezes. Em ambas se determinou o número de células e retirou-se o volume equivalente a  $1 \times 10^6$  células e colocou-se num criovial perfazendo o volume de 1 mL com meio RPMI-C e adicionando 10% de DMSO. Cada tubo de criopreservação foi colocado a  $-20$  °C durante 4 horas, depois a  $-80$  °C durante 2 dias e, por fim, colocado em azoto líquido.

#### **3.2.3.3 Incubação das células com o extrato**

##### **3.2.3.3.1 Preparação das soluções de incubação e Incubação**

A partir do extrato de cereja foram preparadas soluções *stock*. Para a preparação da primeira solução, denominada de extrato bruto, solubilizou-se o extrato similar a caramelo com cor de cereja anteriormente obtido em meio de cultura, tendo-se obtido uma solução a 0,12 g/mL. A solução de extrato digerido consistiu no extrato anteriormente referido sujeito ao processo de digestão *in vitro* em cima descrito, tendo ficado com a mesma concentração final (0,12 g/mL).

A incubação dos extratos com as células foi realizada em placas de cultura de 12 poços com *inserts* onde as células haviam sido semeadas com 21 dias de antecedência, de modo a garantirem uma diferenciação adequada, às quais o meio de cultura foi mudado 16 h depois de semeadas e após esse tempo foi mudado a cada 48 h. Nas 24 h precedentes à incubação com os extratos o meio de cultura existente foi aspirado e colocou-se meio de cultura RPMI-C sem indicador de pH, de modo a que a coloração deste não interferisse com o ensaio *Lucifer Yellow Permeability Assay* explicado no subcapítulo 3.1.5.5. Decorrido este tempo, efetuou-

se o primeiro ensaio TEER e em seguida o meio de cultura do compartimento apical foi aspirado e as culturas celulares foram incubadas com volumes de 500 µL de extrato bruto e extrato digerido. Decorridas 0,5, 1, 2, 4 e 6 h foi retirada uma alíquota da câmara basolateral de cada poço para posterior análise. Após as 6h de incubação realizou-se a segunda medição TEER e o ensaio de permeabilidade do *Lucifer Yellow*.

Os ensaios foram realizados em quadruplicado e de forma independente.

### 3.2.3.4 Ensaio da resistência elétrica transendotelial (TEER)

O ensaio TEER permite monitorizar a integridade de camadas de células em ensaios *in vitro* bem como possíveis alterações nas junções intercelulares, por avaliação da resistência elétrica transendotelial. Consiste na aplicação de um eléctrodo de cada lado da monocamada celular, gerando estes um sinal eléctrico que é medido por um medidor de resistência transendotelial, permitindo calcular a resistência elétrica da barreira (Hickman, 2016).

Antes de colocar as células a incubar com os extratos efetuou-se a primeira medição TEER. Para tal, utilizou-se um medidor de resistência transendotelial com um eléctrodo acoplado. Antes de realizar a medição é necessário um passo de limpeza do eléctrodo, então este foi colocado numa solução de etanol 70% durante aproximadamente 1 minuto, sendo depois retirado da mesma e com movimentos não muito bruscos agitado até secar. De seguida, o eléctrodo foi colocado num tubo com meio de cultura para que o mesmo ficasse equilibrado. Só depois dos passos anteriores se iniciou a medição TEER colocando o eléctrodo dentro de cada poço, de modo a que a parte mais curta ficasse na câmara apical e a parte mais comprida na câmara basolateral, devendo esta última tocar no fundo do poço e fazer um ângulo de aproximadamente 90° com o mesmo. Este procedimento foi repetido em triplicado em toda a placa de cultura de 12 poços.

No fim do período de incubação da cultura celular com os extratos foi realizada a segunda medição TEER tendo-se repetido o procedimento anterior.

A avaliação da resistência elétrica transendotelial da monocamada celular antes e depois da incubação da mesma com os extratos a testar foi calculada com a seguinte fórmula, usando os valores obtidos no ensaio TEER:

$$\text{Resistência elétrica transendotelial} = (\text{média das resistências de cada poço} - \text{média das resistências do branco}) \times \text{área do insert}$$

Foram obtidos os valores de resistência elétrica transendotelial para a monocamada celular, antes da incubação, sendo os valores > 150 Ω cm<sup>2</sup> considerados aceitáveis. Os valores de resistência elétrica transendotelial obtidos depois da incubação com os extratos foram

comparados com os anteriores, com recurso ao teste estatístico *t-Student*, onde se averiguou a existência de diferenças significativas. Foram considerados estatisticamente significativos valores onde  $p < 0,05$  (\*).

### 3.2.3.5 Ensaio da permeabilidade do *Lucifer Yellow*

O ensaio *Lucifer Yellow Permeability* permite avaliar as características de permeabilidade de uma monocamada celular, por medição da difusão passiva de diferentes moléculas através da mesma. O *Lucifer Yellow* é um composto hidrofílico que consegue atravessar a camada de células através dos espaços paracelulares e das junções apertadas, sendo também facilmente detetável por espectroscopia de fluorescência. Este ensaio é também utilizado para verificar a integridade da monocamada celular e determinar se a concentração de trabalho de um composto em estudo perturba essa mesma integridade (Colombini *et al.*, 2013).

O ensaio *Lucifer Yellow Permeability* foi realizado após 6 h de incubação das células com os extratos. O meio foi aspirado em ambas as câmaras delimitadas pelo *insert* e foram colocados 500  $\mu$ L da solução de *Lucifer Yellow* na câmara apical e 1,5 mL do tampão HBSS na câmara basolateral. A placa de cultura foi colocada 1 h a incubar e, decorrido esse tempo, foram pipetados 200  $\mu$ L de cada câmara basolateral para uma outra placa de cultura de 96 poços. Na mesma placa foi adicionado um branco (só com o tampão HBSS) e um controlo positivo (*Lucifer Yellow* 0,1 mg/mL). A fluorescência foi medida a 485 nm (excitação) e 535 nm (emissão) com recurso a um espectrofluorímetro.

A avaliação da permeabilidade e integridade da monocamada celular depois da incubação da mesma com os extratos a testar foi calculada com a seguinte fórmula, usando os valores obtidos no ensaio *Lucifer yellow*:

$$\% \text{ permeabilidade} = \frac{\text{média das fluorescências de cada poço} - \text{fluorescência branco}}{\text{fluorescência controlo positivo} - \text{fluorescência branco}} \times 100$$

Foram obtidos os valores de permeabilidade para a monocamada celular depois da incubação com os extratos. Foram considerados aceitáveis valores inferiores a 3%. Para estudos comparativos foram considerados estatisticamente significativos valores onde  $p < 0,05$  (\*).

### 3.2.4 Quantificação e caracterização do perfil de compostos fenólicos através de HPLC-DAD

As alíquotas recolhidas após a incubação das células com o extrato foram analisadas e quantificadas por HPLC-DAD. O método analítico utilizado para o presente estudo já havia sido anteriormente desenvolvido e validado (Ramos, 2017) segundo os critérios de validação

da *Food and Drug Administration*. Como tal, parâmetros como seletividade, linearidade e modelo de calibração, precisão e exatidão, limites de detecção e quantificação foram estudados a fim de garantir a fiabilidade dos resultados apresentados.

### 3.2.4.1 Seleção de compostos fenólicos usados como padrão e Preparação de Soluções

Para se proceder à quantificação dos compostos fenólicos nas alíquotas de cereja foi selecionado um conjunto de compostos fenólicos que, segundo a literatura estão presentes em cerejas, ou são possíveis metabolitos provenientes dos compostos fenólicos presentes nas mesmas. Perante isto, foram escolhidos os seguintes compostos: epicatequina, rutina, ácido clorogénico, ácido p-coumárico, cianidina-3-O-glicosídeo, quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo, ácido gálico, cianidina e quercetina (figura 8) (Miller *et al.*, 1981), (Ballistreri *et al.*, 2013).

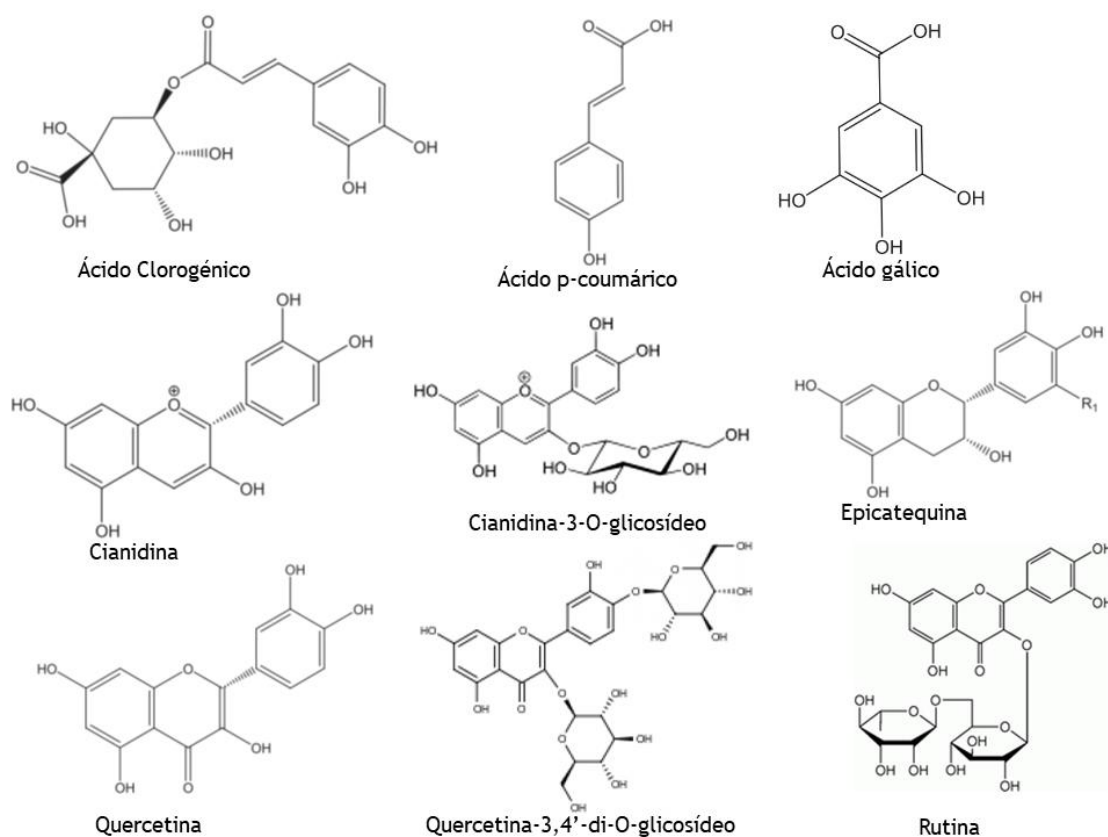


Figura 8- Estrutura química dos compostos fenólicos em estudo. Adaptado (*Phenolic Compound Biochemistry*, 2006).

As soluções padrão dos compostos ácido gálico, ácido p-coumárico, ácido clorogénico, cianidina, cianidina-3-glicosídeo, epicatequina, rutina, quercetina e quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo foram preparadas individualmente em metanol a uma concentração de 1 mg/mL. As mesmas foram acondicionadas em recipientes opacos e conservadas a 4 °C até à sua utilização, à exceção das soluções padrão de cianidina e quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo que foram mantidas a -20°C de modo a diminuir a degradação das mesmas.

### 3.2.4.2 Sistema cromatográfico e Condições cromatográficas

O processo de caracterização e quantificação das alíquotas anteriormente recolhidas foi realizado num sistema de HPLC (modelo 1290 da Agilent, Santa Clara, CA, EUA), com um detetor de fotodiodos (modelo 1260 da Agilent). A separação cromatográfica foi efetuada com recurso a uma coluna Eclipse Plus C18, 3,5 µm, 4,6x100 mm (Agilent Technologies, Soquímica, Portugal).

A fase móvel consistiu numa mistura de acetonitrilo (fase móvel A) e ácido trifluoroacético 0,1% (fase móvel B). Para a preparação desta última pipetou-se 1 mL de ácido trifluoroacético para um balão volumétrico de 1000 mL e perfez-se o restante volume com água milli-Q. De seguida, as soluções referidas foram desgaseificadas em banho ultrassónico durante 15 minutos.

Relativamente às condições cromatográficas foi utilizado um fluxo de 0,5 mL/minuto, em modo gradiente conforme as seguintes condições: Condições iniciais: 10% de acetonitrilo (linha A).

- Do minuto 3 ao 15: 15% de acetonitrilo (linha A).
- Do minuto 15 ao 20: as condições foram mantidas constantes com uma proporção de 15% de fase móvel da linha A.
- Do minuto 20 ao 25: 18% de acetonitrilo (linha A).
- Do minuto 25 ao 40: 30% de acetonitrilo (linha A).
- Do minuto 40 ao 45: período necessário para reequilibrar a coluna, tendo-se voltado às condições iniciais.

O volume de amostra injetado foi de 20 µL, a temperatura da coluna foi de 35 °C e o amostrador foi mantido a uma temperatura de 4 °C. Os comprimentos de onda máximos de cada um dos compostos em análise foram os escolhidos para a deteção dos mesmos, sendo estes 280 nm, 320 nm, 360 nm e 520 nm.

### 3.2.5 Avaliação da atividade antioxidante

O ensaio de DPPH é um ensaio espectral que permite avaliar a atividade antioxidante de um determinado extrato. A molécula de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) é um radical livre de cor violeta que quando sequestrado por determinada substância é reduzido, pela doação de hidrogénio, a hidrazida adquirindo uma coloração amarelo pálido. A absorvância medida a 517 nm é inversamente proporcional à percentagem de inibição e

consequentemente à concentração de antioxidante, uma vez que estes são os responsáveis pela eliminação de radicais livres (Luís *et al.*, 2018).

Para proceder à realização destes ensaios, as alíquotas recolhidas durante o processo de digestão *in vitro* e no decorrer da incubação da cultura celular com os diferentes extratos foram analisadas por este método. Para tal, foi preparado um tubo para cada alíquota para onde foram pipetados 100 µL da amostra a analisar e 3,9 mL de uma solução de DPPH 0,1 mM. Foi também preparado um branco (só com metanol) e um controlo negativo (100 µL metanol + 3,9 mL DPPH). Decorridos 15 minutos, as absorvâncias de cada tubo foram lidas a 517 nm.

A percentagem de inibição de cada alíquota foi calculada com a seguinte fórmula, usando os valores obtidos para as absorvâncias após a realização do ensaio DPPH:

$$\% \text{ inibição} = \frac{\text{absorvância do controlo} - \text{absorvância da amostra}}{\text{absorvância do controlo}} \times 100$$

Foram obtidos os valores da percentagem de inibição para cada uma das alíquotas recolhidas durante a digestão *in vitro* e no decorrer da incubação da cultura celular com os diferentes extratos.

### 3.2.6 Tratamento estatístico

Os resultados são expressos como os valores médios com desvios padrão (SD) e a análise estatística foi realizada utilizando o Microsoft Excel 365. Os valores representados foram obtidos por uma análise de variância unidirecional (*t-Student*) considerando-se estatisticamente significativos valores de  $p < 0,05$  (\*).



## 4. Resultados e Discussão

Conforme o objetivo do presente trabalho, as células Caco-2 foram incubadas com os extratos bruto e digerido do fruto de *Prunus avium L.* de modo a avaliar a biodisponibilidade do conteúdo fenólico, bem como a atividade antioxidante dos mesmos. Para tal, vários ensaios foram realizados não só ao nível celular de modo a garantir que a permeabilidade e integridade celular eram aceitáveis, mas também desde o ponto de vista analítico. Os resultados relativos a cada um destes ensaios encontram-se descritos linhas abaixo.

### 4.1 Determinação do rendimento de extração

Os processos de liofilização e extração não foram realizados pela autora do presente trabalho, porém estes mesmos processos são relevantes para este estudo, pelo que se encontram aqui apresentados.

A extração metanólica da cereja foi realizada no trabalho de R. C. Ramos (Ramos, 2017), tendo-se obtido um rendimento de extração de 93,89 % para a variedade *Saco 2017*, determinado pela comparação do peso da fruta liofilizada e do peso do extrato. Para se efetuar esta determinação partiu-se do pressuposto que o extrato se encontrava completamente isento de água. Na figura 9 pode-se observar o aspeto do fruto no início do processo de extração e na figura 10 encontra-se ilustrado o aspeto final do extrato.



Figura 9- Fruto de *Prunus avium L.* no início do processo de extração (Ramos, 2017).



Figura 10- Fruto de *Prunus avium* L. após extração (Ramos, 2017).

## 4.2 Avaliação global do processo de digestão *in vitro*

O processo de digestão simulada *in vitro* foi aplicado no extrato de cereja Saco 2017, tendo-se preparado os quatro fluidos digestivos imediatamente antes da sua utilização.

No decorrer do processo digestivo foi possível verificar que o extrato sofreu algumas alterações, algumas das quais poderão ser químicas e enzimáticas. Estas foram auxiliadas pela agitação e temperatura. Na figura 11 é possível observar essa mesma evolução.

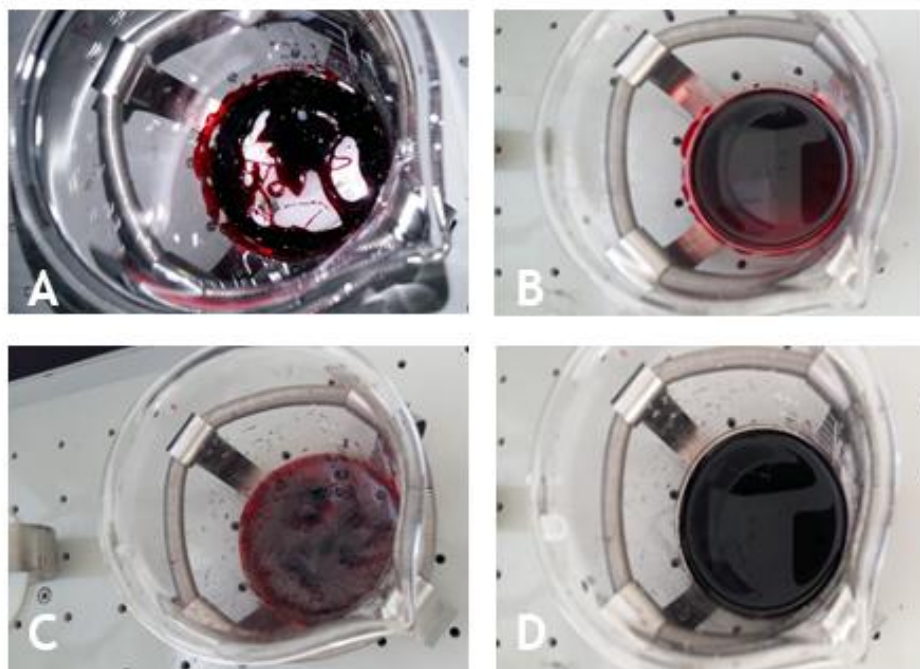


Figura 11- Extrato de cereja antes da digestão (A), após digestão salivar (B), após digestão gástrica (C) e após digestão duodenal e biliar (D).

### 4.3 Avaliação da resistência elétrica da membrana transendotelial de células Caco-2

A integridade da monocamada de células Caco-2, antes de se proceder à incubação com os extratos, foi avaliada através do ensaio TEER, tendo-se obtidos os resultados apresentados na tabela 4.

Tabela 4- Valores TEER obtidos na medição anterior à incubação com os extratos. Os valores apresentados correspondem à média dos quadruplicados obtidos  $\pm$  desvio-padrão (D.P.).

	TEER ( $\Omega \text{ cm}^2$ ) $\pm$ DP
Controlo	645,56 $\pm$ 20,01
Bruto	356,22 $\pm$ 35,72
Digerido	350,00 $\pm$ 65,94

Com base nestas medições podemos verificar que a monocamada celular antes de contactar com os extratos se encontrava íntegra, uma vez que os valores foram superiores ao limiar mínimo aceitável (150-200  $\Omega \text{ cm}^2$ ) (Hellinger *et al.*, 2012). A obtenção dos presentes valores é fundamental para determinar a funcionalidade da morfologia da monocamada de células, podendo esta influenciar a penetração de moléculas na barreira celular (Hellinger *et al.*, 2012).

Após 6h de incubação celular com os extratos bruto e digerido, foi realizada uma segunda medição TEER (tabela 5). Estes valores foram comparados com os da primeira medição (tabela 4), de forma a averiguar a influência dos extratos na integridade celular.

Tabela 5- Valores TEER obtidos na medição posterior ao tempo máximo de incubação (6 h) com os extratos. Os valores apresentados correspondem à média dos quadruplicados obtidos  $\pm$  desvio-padrão (D.P.).

	TEER ( $\Omega \text{ cm}^2$ ) $\pm$ DP
Controlo	682,67 $\pm$ 197,49
Bruto	266,25 $\pm$ 50,33
Digerido	256,00 $\pm$ 80,88

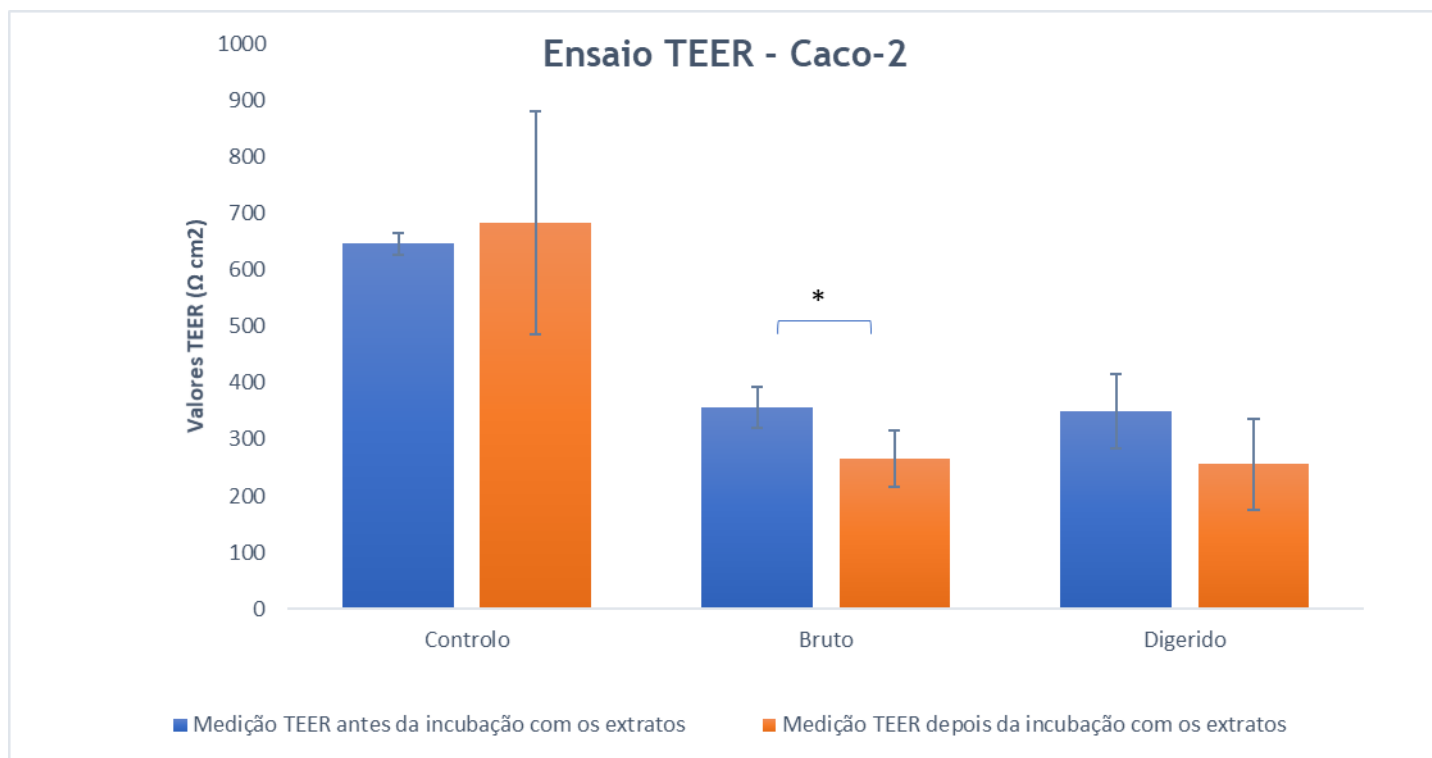


Figura 12-Valores da medição TEER antes e após 6 h de incubação da monocamada celular com os extratos de cereja. Os valores apresentados correspondem à média dos quadruplicado obtidos  $\pm$  desvio-padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$

Como se pode verificar na tabela 5, após a incubação celular com os extratos, os valores de TEER diminuíram, ainda que continuassem superiores a  $150-200 \Omega \text{ cm}^2$ , e, portanto, ainda se pudesse considerar a monocamada de células íntegra (Hellinger *et al.*, 2012). Porém, na figura 12 é possível verificar que o extrato bruto, após 6 h de incubação, promoveu uma diminuição significativa nos valores de TEER, sugerindo que ocorreram alterações significativas na conformação da membrana. Na mesma figura, pode ainda observar-se que o extrato digerido não afetou significativamente as mesmas células no mesmo intervalo de tempo.

Estudos sugerem que a diminuição do valor de TEER em células Caco-2 está relacionado com um aumento de permeabilidade iónica através da membrana plasmática ou através das junções intracelulares, provocadas pelo composto a ser estudado (Narai, Arai and Shimizu, 1997). Há evidências de que algumas substâncias alteram as junções intracelulares, influenciando a função da barreira intestinal que se torna mais permeável. Este aumento de permeabilidade reflete-se numa diminuição de TEER (Lu *et al.*, 2017).

Por vezes, na origem na decréscimo dos valores de TEER está a elevada concentração do  
 Figura 15- Valores da medição TEER antes e após 6 h de incubação da monocamada celular com os extratos de cereja. Os valores apresentados correspondem à média dos quadruplicado obtidos  $\pm$  desvio-padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ (\*).

apresentando este último uma diminuição significativa. Outra causa comumente sugerida para a diminuição do valor em questão é o elevado número de passagens celulares, uma vez

que células mais envelhecidas têm tendência a formar multicamadas (Verhoeckx *et al.*, 2015). Porém, as células utilizadas encontravam-se entre as passagens 30 e 34, sendo estas relativamente baixas. Também a densidade de células semeadas pode influenciar a medição TEER pois interfere com a capacidade de proliferação, não permitindo, por vezes, a divisão celular mínima (Verhoeckx *et al.*, 2015). Todavia, mais uma vez isto não é válido para o presente trabalho, pois a densidade celular utilizada foi a recomendada pelo fabricante.

#### 4.4 Avaliação da permeabilidade da membrana transendotelial

A permeabilidade da monocamada de células Caco-2, após a incubação com os extratos foi avaliada pelo ensaio de permeabilidade do *Lucifer Yellow*, tendo-se obtidos os resultados apresentados na tabela 6.

Tabela 6- Percentagem de permeabilidade das células Caco-2 após 6 h de incubação com os extratos de cereja  $\pm$  desvio-padrão (D.P.).

	Permeabilidade (%) $\pm$ DP
Controlo	0,205 $\pm$ 0,108
Bruto	0,438 $\pm$ 0,050
Digerido	0,304 $\pm$ 0,082

Como se pode verificar na tabela 6, os valores obtidos para a percentagem de permeabilidade da monocamada celular são inferiores a 3%. Segundo o protocolo descrito pelo fabricante (Sigma-Aldrich®), no qual se baseou este ensaio, os valores são considerados aceitáveis, pelo que podemos inferir que a monocamada de células se encontrava com uma permeabilidade eficiente e adequada à passagem dos compostos a analisar (Sigma-Aldrich, 2013).

Foi também efetuado o estudo da evolução da percentagem de permeabilidade das células com e sem incubação com os extratos de cereja, tendo-se obtido os resultados presentes na figura 13.

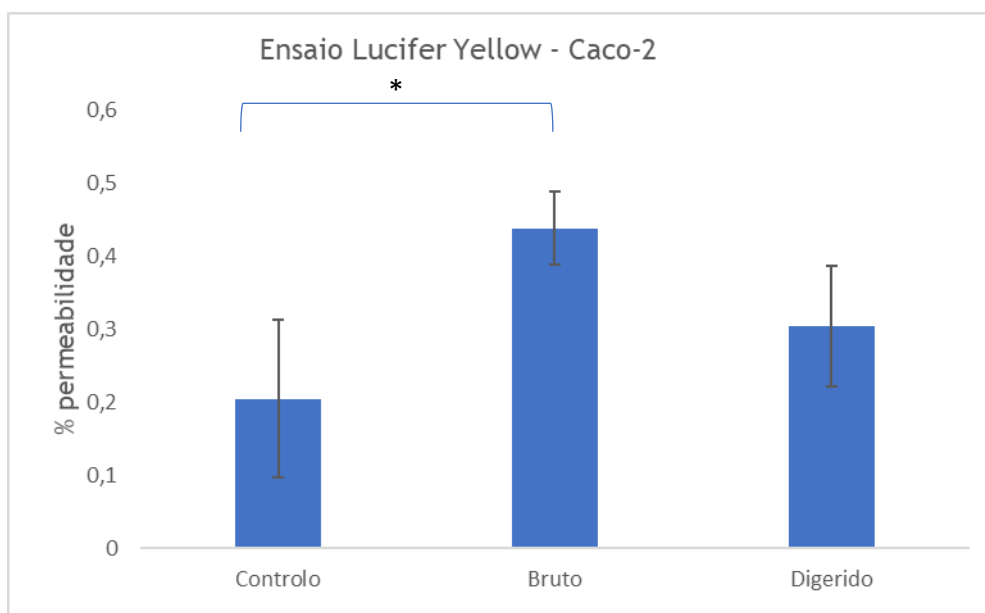


Figura 13-Percentagem de permeabilidade de células Caco-2 após 6 h de incubação com os extratos, comparativamente aos controlos (\* $p < 0,05$ ).

Na análise da figura 13 é possível verificar que ocorreu um aumento significativo da percentagem de permeabilidade da monocamada celular depois da incubação com extrato bruto, relativamente ao controlo. O mesmo não foi observado para o extrato digerido, após o mesmo tempo de incubação.

Estes resultados são concordantes com os anteriormente obtidos para a medição TEER. De facto, vários estudos descrevem o aumento significativo da permeabilidade em células Caco-2 após incubação com diferentes compostos, acompanhado do decréscimo do valor de TEER (Satsu *et al.*, 2001), (Piccolino, Neyton and Gerschenfeld, 1984). Esta variação sugere que a função da barreira celular bem como os espaços intracelulares, e consequentemente a sua permeabilidade, foram alteradas após incubação (Satsu *et al.*, 2001), (Piccolino, Neyton and Gerschenfeld, 1984), (Cui *et al.*, 2010).

Perante isto, existe a possibilidade do extrato bruto de alguma forma induzir danos na monocamada celular, interferindo com a sua integridade e aumentando a sua permeabilidade. Para o extrato digerido isto não se verifica, possivelmente porque após digestão os compostos aqui presentes sofreram modificações tendo sido degradados noutros mais pequenos que por sua vez foram menos suscetíveis a danificar a integridade da monocamada celular.

## 4.5 Caracterização dos compostos fenólicos após digestão *in vitro* e após incubação celular

### 4.5.1 Quantificação dos compostos fenólicos após digestão *in vitro* e após incubação celular

Os compostos fenólicos presentes nas cerejas foram quantificados no trabalho de R. C. Ramos (Ramos, 2017), tendo-se obtido os resultados presentes na tabela 7.

Tabela 7- Quantificação de compostos fenólicos para a variedade Saco 2017  $\pm$  desvio-padrão (D.P.).

Composto	Quantificação ( $\mu\text{g/g}$ extrato) $\pm$ DP
Quercetina	Não detetado
Ácido clorogénico	177 $\pm$ 0,10
Ácido gálico	30,6 $\pm$ 0,01
Ácido p-coumárico	136,8 $\pm$ 0,01
Rutina	639,6 $\pm$ 0,07
Epicatequina	90,6 $\pm$ 0,15
Cianidina	Não detetado
Cianidina-3-O-glicosídeo	1321,8 $\pm$ 0,74
Quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo	1476,6 $\pm$ 0,42

Como já referido anteriormente, após a incubação dos extratos bruto (0,12g/mL) e digerido (0,12g/mL) com as culturas celulares, foram recolhidas alíquotas às 0,5, 1, 2, 4 e 6 h. Posteriormente procedeu-se à quantificação dos compostos fenólicos selecionados por HPLC-DAD, tendo-se obtido os resultados que se seguem (tabela 8 e figuras 14 e 15).

Tabela 8- Concentração dos compostos fenólicos nas alíquotas recolhidas após os diferentes tempos de incubação com o extrato digerido ( $\mu\text{g/g}$  extrato)  $\pm$  desvio padrão (D.P.).

Tempo (h)	Ácido gálico ( $\mu\text{g/g}$ extrato) $\pm$ DP	Epicatequina ( $\mu\text{g/g}$ extrato) $\pm$ DP	Ácido clorogénico ( $\mu\text{g/g}$ extrato) $\pm$ DP	Ácido p-coumárico ( $\mu\text{g/g}$ extrato) $\pm$ DP	Quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo ( $\mu\text{g/g}$ extrato) $\pm$ DP	Rutina ( $\mu\text{g/g}$ extrato) $\pm$ DP	Cianidina-3-O-glicosídeo ( $\mu\text{g/g}$ extrato) $\pm$ DP
0,5	0,067 $\pm$ 0,005	0,000 $\pm$ 0,000	0,258 $\pm$ 0,072	0,116 $\pm$ 0,001	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000	0,000 $\pm$ 0,000
1	0,080 $\pm$ 0,003	0,000 $\pm$ 0,000	0,385 $\pm$ 0,080	0,116 $\pm$ 0,000	0,363 $\pm$ 0,002	0,002 $\pm$ 0,003	0,241 $\pm$ 0,005
2	1,454 $\pm$ 0,096	0,000 $\pm$ 0,000	1,312 $\pm$ 0,151	0,122 $\pm$ 0,001	0,373 $\pm$ 0,002	0,146 $\pm$ 0,024	0,329 $\pm$ 0,015
4	1,793 $\pm$ 0,038	0,000 $\pm$ 0,000	3,499 $\pm$ 0,248	0,137 $\pm$ 0,003	0,407 $\pm$ 0,006	0,509 $\pm$ 0,049	0,453 $\pm$ 0,022
6	1,749 $\pm$ 0,021	0,335 $\pm$ 0,025	3,241 $\pm$ 0,414	0,133 $\pm$ 0,002	0,403 $\pm$ 0,007	0,492 $\pm$ 0,026	0,396 $\pm$ 0,020

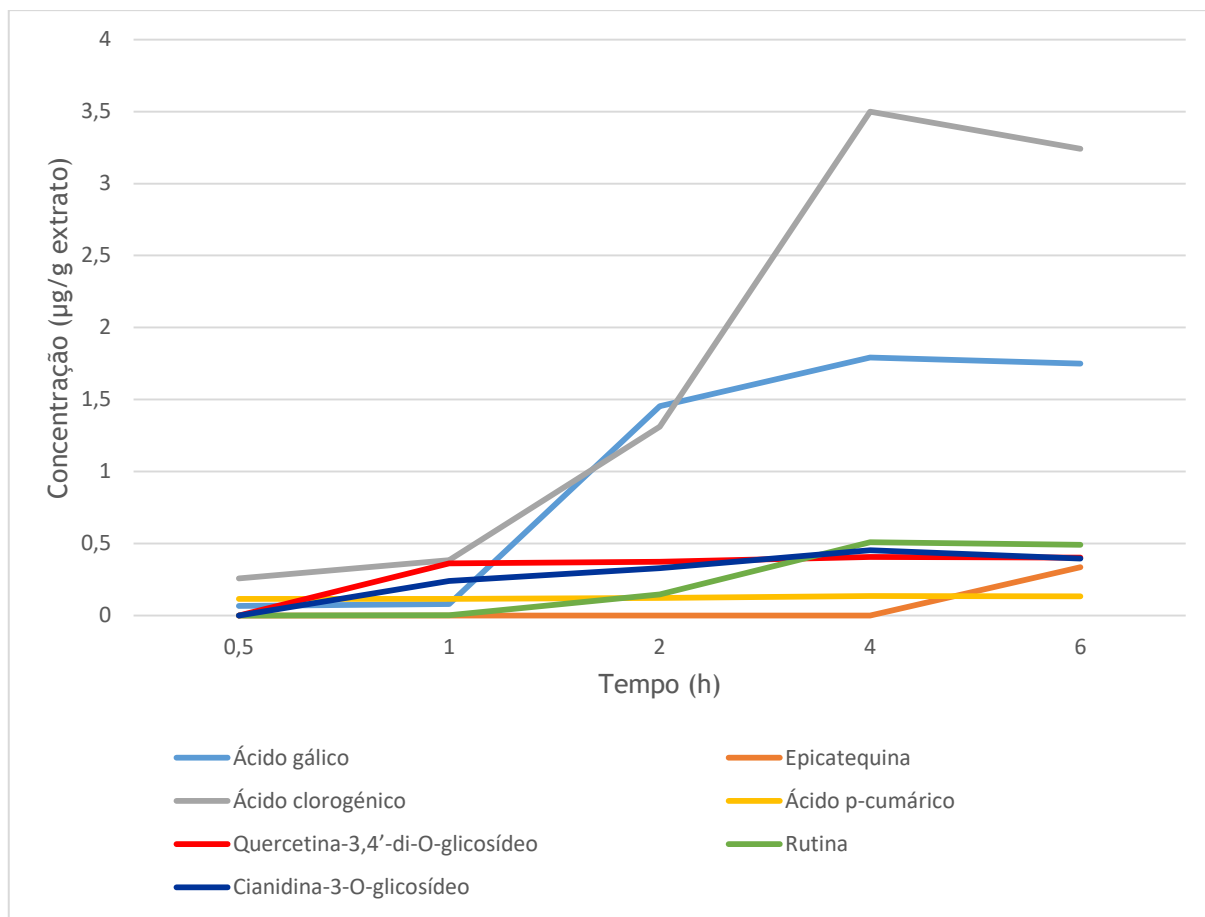


Figura 14-Concentração dos compostos fenólicos nas alíquotas recolhidas após os diferentes tempos de incubação com o extrato digerido ( $\mu\text{g/g}$  extrato).

Tendo como base a tabela 8 e a figura 14 podemos verificar que o ácido gálico e o ácido clorogénico são os compostos fenólicos, presentes no extrato digerido, que atravessam a monocamada celular em maior quantidade. A sua concentração vai aumentando gradualmente no compartimento basolateral até às 4h de incubação, diminuindo depois de 6h em contacto com as células.

Relativamente à quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo e à cianidina-3-O-glicosídeo, presentes no mesmo extrato, é possível verificar que estes compostos se acumulam, de forma mais acentuada, na câmara basolateral durante a primeira hora de incubação. Decorrido esse tempo, a sua concentração continua a aumentar, porém de forma mais gradual. Ao fim de 6h de incubação verifica-se um ligeiro decréscimo na quantidade destes dois compostos fenólicos.

No que respeita à rutina, pode-se constatar que durante a primeira hora de incubação a mesma não é detetada, todavia, a partir desse momento e até às 4h é notório o aumento progressivo da concentração deste composto no compartimento basolateral, diminuindo após 6h de incubação.

Em relação à epicatequina e ao ácido p-cumárico verifica-se que são os compostos fenólicos, presentes no extrato digerido, que atravessam a monocamada celular em menor quantidade. Contudo, enquanto que o ácido p-coumárico se mantém mais ou menos constante ao longo do processo de incubação, a epicatequina apenas é detetada após 6h do mesmo processo.

Por oposição, durante o processo de incubação com o extrato bruto, apenas a quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo conseguiu atravessar a monocamada celular. Foi possível verificar um aumento substancial da concentração do mesmo composto, na câmara basolateral, após 1h de incubação. Esta concentração manteve-se constante até às 4h do mesmo processo, tendo depois diminuído até à concentração inicial (figura 15).

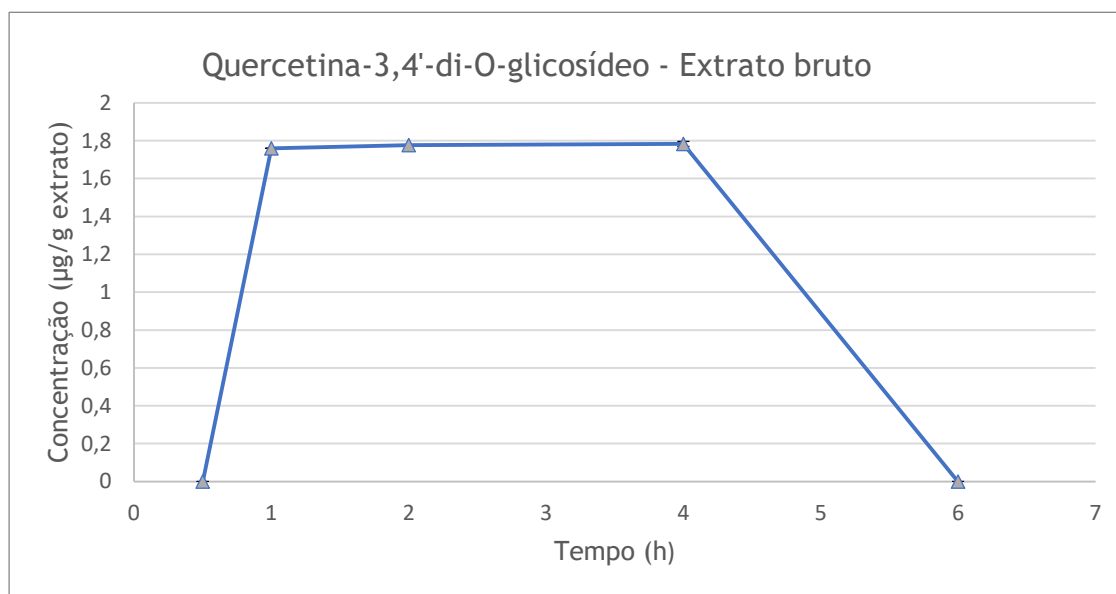


Figura 15 Concentração de quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo nas alíquotas recolhidas após os diferentes tempos de incubação com o extrato bruto ( $\mu\text{g/g}$  extrato).

Para além destes sete compostos fenólicos também se procedeu à deteção por HPLC-DAD de quercetina e cianidina, tendo-se verificado a ausência das mesmas quer após incubação com o extrato bruto, quer após incubação com o extrato digerido.

Em suma, podemos verificar que, à exceção da quercetina e da cianidina, os compostos fenólicos presentes no extrato digerido, e para os quais foram selecionados padrões, conseguiram atravessar a monocamada celular, encontrando-se presentes nas alíquotas recolhidas da câmara basolateral. O mesmo não se verificou no extrato bruto, uma vez que apenas a quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo foi detetada nessas mesmas alíquotas. Isto leva a concluir que os compostos deste extrato não conseguem atravessar a monocamada de células. Estes resultados foram comparados com os obtidos noutros trabalhos, todavia importa frisar que são pouquíssimos os estudos desenvolvidos nesta área, não se encontrando nenhum onde se tenha avaliado a biodisponibilidade do fruto de *Prunus avium* L. em culturas celulares Caco-2.

No estudo de R. C. Ramos (Ramos, 2017) foram quantificados os mesmos compostos na mesma amostra de cereja após digestão *in vitro*, utilizando o mesmo equipamento de HPLC-DAD usado neste trabalho. Foi verificado um aumento de ácido gálico e ácido p-coumárico, possivelmente libertados de outros compostos que sofreram degradação durante o processo digestivo. Também a epicatequina aumentou muito ao longo da digestão. Pelo contrário, os glicosídeos rutina, cianidina-3-O-glicosídeo e quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo diminuíram substancialmente, sugerindo que os mesmos se degradaram. Tal como seria expectável, ocorreu um aumento de quercetina, possivelmente devido à degradação destes mesmos glicosídeos. Foi ainda constatado que a quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo foi o composto encontrado em maior quantidade. Aquando da comparação destes resultados com os do presente trabalho é possível verificar que todos os compostos diminuíram substancialmente após a passagem pela monocamada celular. Também os compostos mais abundantes diferem, enquanto que no trabalho referido foram a quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo, cianidina-3-O-glicosídeo e rutina, no presente estudo os compostos presentes com maior concentração foram o ácido clorogénico e o ácido gálico. Contudo o aumento deste último havia sido verificado no referido estudo. Tanto neste trabalho como no de R. C. Ramos (Ramos, 2017) não foi detetada cianidina.

Numa investigação desenvolvida por Rubió *et al.* (Rubio *et al.*, 2014) estudou-se o efeito da digestão *in vitro* na bioacessibilidade de compostos fenólicos presentes em azeite aromatizado com tomilho, recorrendo a modelos celulares Caco-2 e HepG-2. Os resultados indicaram que a bioacessibilidade dos compostos aumentou quando os extratos foram digeridos. Também foi verificado um aumento da passagem de flavonoides pela barreira celular após digestão. Estes resultados estão de acordo com os obtidos no presente trabalho, uma vez que também se verificou um aumento da passagem dos compostos pela monocamada celular aquando da digestão do extrato. Pelo contrário, os compostos presentes no extrato bruto, que não sofreu digestão, tiveram uma taxa de absorção muito inferior.

Um outro estudo desenvolvido por Toydemir *et al.* (Toydemir *et al.*, 2013) avaliou a biodisponibilidade de epicatequina e cianidina-3-O-glicosídeo em cereja ácida (*Prunus cerasus L.*) e no seu sumo, recorrendo à incubação celular com células Caco-2 e posterior quantificação por HPLC-FLD. No referido trabalho verificou-se que após a passagem, tanto do sumo como do fruto, pela monocamada de células a concentração de ambos os compostos em estudo era menor. Isto corrobora a comparação anterior, uma vez que a mesma diminuição foi verificada.

Ainda noutro trabalho realizado por M. Fazzari *et al.* (Fazzari *et al.*, 2008), foi simulada uma digestão *in vitro* em extratos de diferentes variedades de cerejas, tendo-se recorrido a uma membrana de diálise com o intuito de simular a parede intestinal. A um dos lados da membrana foi dado o nome de “acessível ao soro” e ao outro “acessível ao cólon”. Verificou-se que a percentagem de compostos fenólicos que atravessava a membrana deslocando-se

para o lado “acessível ao soro” era muito inferior à do lado oposto. Mais uma vez, estes resultados vão de encontro ao já referido, o que leva a crer que os compostos fenólicos conseguem atravessar a monocamada celular que simula o epitélio intestinal. Porém durante este processo algumas destas substâncias perdem-se, ou não conseguem atravessar a já referida monocamada, refletindo-se numa menor quantidade destes compostos no compartimento que simula o acesso à corrente sanguínea.

#### 4.6 Avaliação da atividade antioxidantes dos extratos após digestão *in vitro* e após incubação celular

A análise da atividade antioxidante dos extratos após cada passo da digestão *in vitro*, e das alíquotas recolhidas depois da incubação dos extratos bruto e digerido durante 0,5, 1, 2, 4 e 6 h, foi realizada pelo ensaio de DPPH. Os resultados obtidos apresentam-se na tabela 9.

Tabela 9- Atividade antioxidante dos extratos após os vários passos da digestão e tempos de incubação.

Tempo de incubação	Amostra	Inibição DPPH (%) $\pm$ DP
Inicial (tempo zero)	Extrato Bruto	83,18 $\pm$ 0,21
	Extrato Digestão Salivar	41,28 $\pm$ 0,47
	Extrato Digestão Gástrica	72,40 $\pm$ 0,03
	Extrato Digestão Duodenal	63,23 $\pm$ 0,01
0,5 h	Extrato Bruto	0 $\pm$ 0,00
	Extrato Digerido	0 $\pm$ 0,00
1 h	Extrato Bruto	0 $\pm$ 0,00
	Extrato Digerido	0 $\pm$ 0,00
2 h	Extrato Bruto	0 $\pm$ 0,00
	Extrato Digerido	0 $\pm$ 0,00
4 h	Extrato Bruto	0 $\pm$ 0,00
	Extrato Digerido	0 $\pm$ 0,00
6 h	Extrato Bruto	0 $\pm$ 0,00

---

 Extrato Digerido
 

---

0 ± 0,00

Com base na tabela anterior, observou-se que a atividade antioxidante é máxima no extrato do fruto de *Prunus avium L.* antes de este sofrer qualquer processo de digestão, diminuindo para aproximadamente metade após a digestão salivar. Já na digestão gástrica verifica-se um novo aumento de percentagem de inibição de DPPH, e conseqüentemente de atividade antioxidante, que diminui ligeiramente na digestão duodenal. Contrariamente, todas as alíquotas recolhidas após incubação dos extratos com a cultura celular, independentemente do tempo decorrido, não demonstraram atividade antioxidante.

Os resultados referentes à atividade antioxidante obtida para as alíquotas recolhidas durante a processo digestivo podem ser explicados pela variação do conteúdo fenólico durante a digestão *in vitro* observados no trabalho de R. C. Ramos (Ramos, 2017). Neste, verificou-se que quatro dos polifenóis avaliados, nomeadamente a epicatequina, ácido gálico, ácido clorogénico e cianidina-3-O-glicosídeo, aumentaram a sua concentração durante a digestão gástrica, e a mesma diminuiu aquando da digestão duodenal. Já a quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo e a rutina mantiveram-se constantes durante a digestão salivar e gástrica, tendo apenas diminuído durante a digestão duodenal.

Já os resultados referentes às alíquotas recolhidas após a incubação com as células vão de encontro aos obtidos no presente trabalho e nos estudos efetuados por M. Fazzari *et al.* (Fazzari *et al.*, 2008) e por Toydemir *et al.* (Toydemir *et al.*, 2013). Como referido anteriormente, a concentração fenólica após a passagem pela monocamada celular diminui substancialmente, pelo que a atividade antioxidante nestas alíquotas também será menor, refletindo-se numa menor, ou neste caso não existente, percentagem de inibição do radical DPPH.

A percentagem de cada composto que atravessa a monocamada celular também foi calculada, com base nos valores relativos à concentração de cada composto no extrato bruto (dados obtidos de (Ramos, 2017)). Os resultados obtidos encontram-se descritos na tabela 10.

*Tabela 10- Percentagem de cada composto que atravessa a monocamada celular relativamente à composição inicial do extrato (percentagem relativa à composição inicial no extrato de cereja (Ramos, 2017)).*

Composto	Quantidade de composto que atravessa a monocamada celular (%)
Ácido gálico	5,716
Ácido p-coumárico	0,097

<b>Epicatequina</b>	0,370
<b>Rutina</b>	0,077
<b>Ácido clorogénico</b>	1,831
<b>Quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo</b>	0,027
<b>Cianidina-3-O-glicosídeo</b>	0,030

Tendo como base a tabela anterior é possível verificar que apenas uma percentagem muito pequena de cada composto consegue atravessar a monocamada celular e ficar biodisponível. Tal como era expetável, os compostos menos absorvidos foram os glicosídeos (rutina, quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo e cianidina-3-O-glicosídeo), possivelmente devido ao seu tamanho. Já os ácidos gálico e clorogénico foram os mais absorvidos. Mais uma vez, estes resultados corroboram os verificados na medição da atividade antioxidante, justificando a diferença de valores obtidos antes e depois da incubação dos extratos com a monocamada celular.

## 5. Conclusões e Perspetivas futuras

O cuidado com a alimentação tem vindo a crescer e a tornar-se uma prioridade nos últimos anos. Assim, o interesse pelos compostos fenólicos, bem como pelos alimentos onde os mesmos estão presentes tem vindo também a aumentar. Isto deve-se em muito à sua atividade antioxidante e às propriedades benéficas para o organismo.

A cereja é uma dessas matrizes alimentares, uma vez que é rica em polifenóis. Contudo, os estudos acerca da sua biodisponibilidade são poucos, não sendo muito claro o comportamento do conteúdo fenólico aquando da absorção intestinal.

A realização deste trabalho permitiu demonstrar a absorção ao nível intestinal dos compostos fenólicos do fruto de *Prunus avium L.* e, conseqüentemente, a sua biodisponibilidade. No geral, verificou-se que após sofrerem um processo de digestão simulada, os polifenóis detetados e identificados nos extratos de cerejas conseguiram ser absorvidos pela barreira celular, tornando-se biodisponíveis (figura 16). Porém, estes mesmos compostos apresentavam-se em concentrações bastante menores, não demonstrando qualquer atividade antioxidante, facto que não se verificou antes da passagem pela monocamada celular. Contudo, importa ressaltar que a porção de fruta, e conseqüentemente, de extrato utilizado é muito pequena, pelo que a quantidade de compostos fenólicos presentes no mesmo também é menor. Assim, a ausência de atividade antioxidante pode dever-se a isso mesmo, não invalidando que a mesma possa ser verificada em quantidades maiores de cereja.

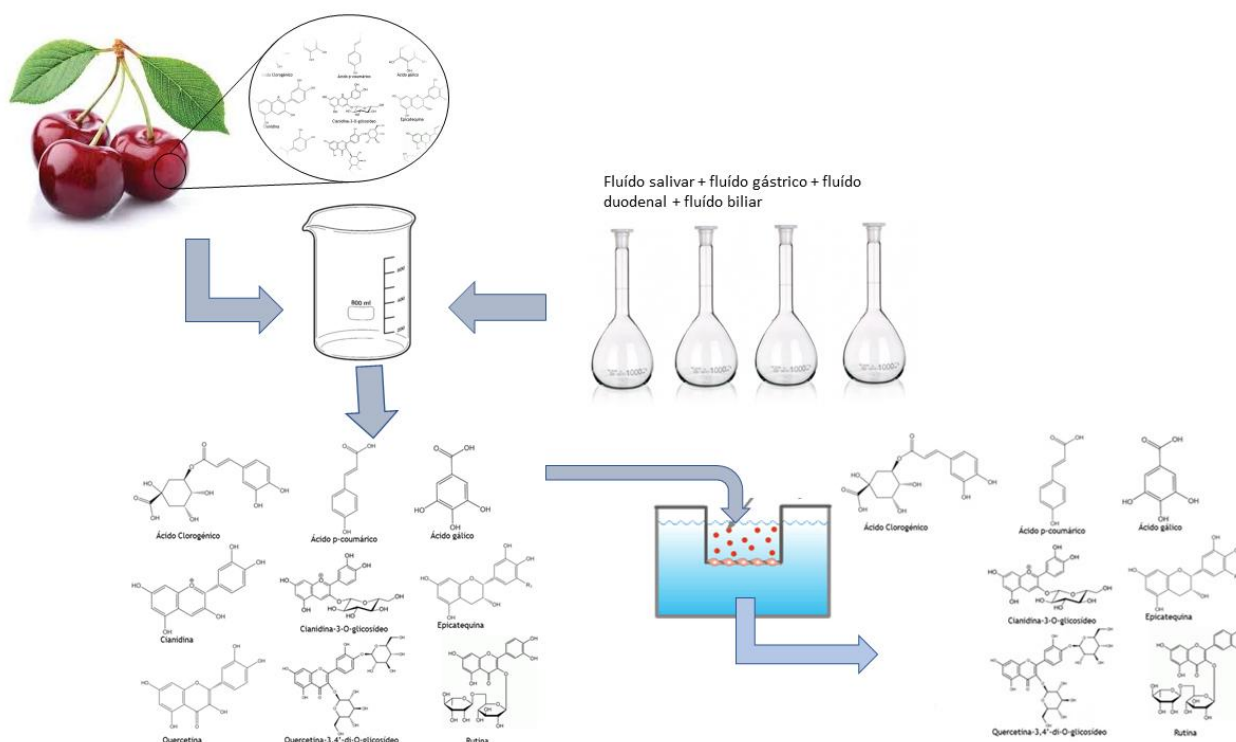


Figura 16 Esquema síntese do processo de digestão e absorção dos compostos fenólicos presentes no fruto de *Prunus avium L.*

Contrariamente, quando o mesmo extrato de cereja não sujeito a digestão foi colocado em contacto com a mesma camada de células apenas a quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo conseguiu atravessar a mesma e tornar-se biodisponível. Pelo que se pode concluir que a digestão é um processo indispensável para que ocorra absorção, pois sem ele o conteúdo fenólico da matriz alimentar não fica bioacessível.

O presente estudo também permitiu verificar que após incubação celular com o extrato bruto, a integridade da monocamada celular ficou alterada e a permeabilidade da mesma aumentou. O mesmo não foi verificado após a incubação com o extrato que sofreu o processo digestivo. Isto sugere que os compostos que interferem com as junções intercelulares presentes no extrato bruto, após o processo digestivo, sofrem modificações, sendo degradados noutros mais pequenos que por sua vez deixam de afetar a integridade e permeabilidade celular.

Todavia, o presente trabalho é apenas um ensaio *in vitro*, pelo que todas as conclusões devem ser consideradas com precaução. Assim, são necessárias investigações futuras, nomeadamente recorrendo a coculturas celulares, desta e outra linha celular, de modo a que seja possível uma aproximação mais real do epitélio intestinal e para colmatar falhas e desvantagens das mesmas. Posteriormente, ensaios *in vivo* devem ser também realizados, de modo a confirmar os resultados anteriormente obtidos.

## 6. Referências

- Acosta-Estrada, B. A., Gutiérrez-Urbe, J. A., and Serna-Saldívar, S. O. (2014). Bound phenolics in foods, a review. *Food Chemistry*, 152, 46-55. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.11.093>
- Andreotti, C., Ravaglia, D., Ragaini, A., and Costa, G. (2008). Phenolic compounds in peach (*Prunus persica*) cultivars at harvest and during fruit maturation. *Annals of Applied Biology*, 153(1), 11-23. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00234.x>
- ATCC. (2018). ATCC: The Global Bioresource Center. Retrieved 25 May 2018, from [https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo\\_country=pt](https://www.lgcstandards-atcc.org/?geo_country=pt)
- Ballistreri, G., Continella, A., Gentile, A., Amenta, M., Fabroni, S., and Rapisarda, P. (2013). Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chemistry*, 140(4), 630-638. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.11.024>
- Barthe, L., Woodley, J., and Houin, G. (1999). Gastrointestinal absorption of drugs: methods and studies. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 13(2), 154-168. <https://doi.org/10.1111/j.1472-8206.1999.tb00334.x>
- Bastos, C., Barros, L., Dueñas, M., Calhella, R. C., Queiroz, M. J. R. P., Santos-Buelga, C., and Ferreira, I. C. F. R. (2015). Chemical characterisation and bioactive properties of *Prunus avium* L.: The widely studied fruits and the unexplored stems. *Food Chemistry*, 173, 1045-1053. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.10.145>
- Bird, I. M. (1989). High performance liquid chromatography: principles and clinical applications. *BMJ (Clinical Research Ed.)*, 299(6702), 783-7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2508923>
- Carbonell-Capella, J. M., Buniowska, M., Barba, F. J., Esteve, M. J., and Frígola, A. (2014). Analytical Methods for Determining Bioavailability and Bioaccessibility of Bioactive Compounds from Fruits and Vegetables: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 13(2), 155-171. <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12049>
- CERFUNDÃO. (2018). Produtos Tradicionais Portugueses - Cereja do Fundão. Retrieved 23 May 2018, from <https://tradicional.dgadr.gov.pt/pt/cat/frutos-frescos/978-cereja-do-fundao-igp>
- Chaovanalikit, A., and Wrolstad, R. E. (2004). Total Anthocyanins and Total Phenolics of Fresh and Processed Cherries and Their Antioxidant Properties. *Journal of Food Science*, 69(1), FCT67-FCT72. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb17858.x>
- Cherry, S., Sato, C., and Arakawa, N. O. (1993). Effect of Ultraviolet Light on Anthocyanin Synthesis in Light-Colored. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.*, 62(3), 543-546. Retrieved from [https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjshs1925/62/3/62\\_3\\_543/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjshs1925/62/3/62_3_543/_pdf)
- Cheyrier, V., Tomas-Barberan, F. A., and Yoshida, K. (2015). Polyphenols: From Plants to a Variety of Food and Nonfood Uses. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(35), 7589-7594. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b01173>
- Chuang, C., and McIntosh, M. K. (2011). Potential Mechanisms by Which Polyphenol-Rich Grapes Prevent Obesity-Mediated Inflammation and Metabolic Diseases. *Annual Review of Nutrition*, 31(1), 155-176. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-072610-145149>
- Colombini, A., Perego, S., Ardoino, I., Marasco, E., Lombardi, G., Fiorilli, A., and Ferraretto, A. (2013). Evaluation of a possible direct effect by casein phosphopeptides on

paracellular and vitamin D controlled transcellular calcium transport mechanisms in intestinal human HT-29 and Caco2 cell lines. *Food & Function*, 4(8), 1195. <https://doi.org/10.1039/c3fo60099h>

Commisso, M., Bianconi, M., Di Carlo, F., Poletti, S., Bulgarini, A., Munari, F., and Guzzo, F. (2017). Multi-approach metabolomics analysis and artificial simplified phytocomplexes reveal cultivar-dependent synergy between polyphenols and ascorbic acid in fruits of the sweet cherry (*Prunus avium* L.). *PLOS ONE*, 12(7), e0180889. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0180889>

Crozier, A., Del Rio, D., and Clifford, M. N. (2010). Bioavailability of dietary flavonoids and phenolic compounds. *Molecular Aspects of Medicine*, 31(6), 446-467. <https://doi.org/10.1016/J.MAM.2010.09.007>

Cui, W., Li, L. X., Sun, C. M., Wen, Y., Zhou, Y., Dong, Y. L., and Liu, P. (2010). Tumor necrosis factor alpha increases epithelial barrier permeability by disrupting tight junctions in Caco-2 cells. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 43(4), 330-337. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2010007500020>

D'Archivio, M., Filesi, C., Vari, R., Scaccocchio, B., and Masella, R. (2010). Bioavailability of the polyphenols: status and controversies. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(4), 1321-42. <https://doi.org/10.3390/ijms11041321>

Daglia, M. (2012). Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 174-181. <https://doi.org/10.1016/J.COPBIO.2011.08.007>

Del Rio, D., Costa, L. G., Lean, M. E. J., and Crozier, A. (2010). Polyphenols and health: what compounds are involved? *Nutrition, Metabolism, and Cardiovascular Diseases: NMCD*, 20(1), 1-6. <https://doi.org/10.1016/j.numecd.2009.05.015>

Devkar, S. T., Kandhare, A. D., Sloley, B. D., Jagtap, S. D., Lin, J., Tam, Y. K., and Hegde, M. V. (2015). Evaluation of the bioavailability of major withanolides of *Withania somnifera* using an in vitro absorption model system. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*, 6(4), 159-64. <https://doi.org/10.4103/2231-4040.165023>

Duthie, G. G., Pedersen, M. W., Gardner, P. T., Morrice, P. C., Jenkinson, A. M., McPhail, D. B., and Steele, G. M. (1988). *European journal of clinical nutrition. European Journal of Clinical Nutrition* (Vol. 52). J. Libbey. Retrieved from <https://abdn.pure.elsevier.com/en/publications/the-effect-of-whisky-and-wine-consumption-on-total-phenol-content>

Fazzari, M., Fukumoto, L., Mazza, G., Livrea, M. A., Tesoriere, L., Marco, and L. Di. (2008). In Vitro Bioavailability of Phenolic Compounds from Five Cultivars of Frozen Sweet Cherries (*Prunus avium* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(10), 3561-3568. <https://doi.org/10.1021/jf073506a>

Ferretti, G., Bacchetti, T., Belleggia, A., and Neri, D. (2010). Cherry Antioxidants: From Farm to Table. *Molecules*, 15(10), 6993-7005. <https://doi.org/10.3390/molecules15106993>

Gao, L., and Mazza, G. (1995). Characterization, Quantitation, and Distribution of Anthocyanins and Colorless Phenolics in Sweet Cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43(2), 343-346. <https://doi.org/10.1021/jf00050a015>

Gliszczynska-Swiglo, A., and Tyrakowska, B. (2003). Quality of Commercial Apple Juices Evaluated on the Basis of the Polyphenol Content and the TEAC Antioxidant Activity. *Journal of Food Science*, 68(5), 1844-1849. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb12340.x>

Gonçalves, B., Landbo, A., Knudsen, D., Silva, A., Moutinho-Pereira, J., Rosa, E., and Meyer,

- A. S. (2004). Effect of Ripeness and Postharvest Storage on the Phenolic Profiles of Cherries (*Prunus avium* L.). <https://doi.org/10.1021/JF030595S>
- Gordon J. McDougall, Patricia Dobson, Pauline Smith, Alison Blake, and Stewart, D. (2005). Assessing Potential Bioavailability of Raspberry Anthocyanins Using an in Vitro Digestion System. <https://doi.org/10.1021/JF050131P>
- Grigoras, C. G., Destandau, E., Zubrzycki, S., and Elfakir, C. (2012). Sweet cherries anthocyanins: An environmental friendly extraction and purification method. *Separation and Purification Technology*, 100, 51-58. <https://doi.org/10.1016/J.SEPUR.2012.08.032>
- Günzler, H., and Williams, A. (2001). *Handbook of analytical techniques*. Wiley-VCH.
- Haibo Wang, Muraleedharan G. Nair, Gale M. Strasburg, Yu-Chen Chang, Alden M. Booren, J. Ian Gray, and DeWitt, D. L. (1999). Antioxidant and Antiinflammatory Activities of Anthocyanins and Their Aglycon, Cyanidin, from Tart Cherries. <https://doi.org/10.1021/NP980501M>
- Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Plata-Oviedo, M. S. V., and Peralta, R. M. (2012). Phenolic compounds in fruits - an overview. *International Journal of Food Science & Technology*, 47(10), 2023-2044. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2012.03067.x>
- Hellinger, É., Veszelka, S., Tóth, A. E., Walter, F., Kittel, Á., Bakk, M. L., and Vastag, M. (2012). Comparison of brain capillary endothelial cell-based and epithelial (MDCK-MDR1, Caco-2, and VB-Caco-2) cell-based surrogate blood-brain barrier penetration models. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 82(2), 340-351. <https://doi.org/10.1016/J.EJPB.2012.07.020>
- Hickman, J. (2016). Transepithelial/endothelial Electrical Resistance (TEER) theory and applications for microfluidic body-on-a-chip devices. *Journal of Rare Diseases Research & Treatment*, 1(3), 46-52. <https://doi.org/10.29245/2572-9411/2016/3.1026>
- I. Marina Heinonen, Anne S. Meyer, and Frankel, E. N. (1998). Antioxidant Activity of Berry Phenolics on Human Low-Density Lipoprotein and Liposome Oxidation. <https://doi.org/10.1021/JF980181C>
- Ieri, F., Pinelli, P., and Romani, A. (2012). Simultaneous determination of anthocyanins, coumarins and phenolic acids in fruits, kernels and liqueur of *Prunus mahaleb* L. *Food Chemistry*, 135(4), 2157-2162. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2012.07.083>
- Ignat, I., Volf, I., and Popa, V. I. (2011). A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, 126(4), 1821-1835. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.12.026>
- Jin, A., Li, X., Zhu, Y., Yu, H. Yu., Pi, H.F., Zhang, P., and Ruan, H.L. (2014). Four new compounds from the bulbs of *Lycoris aurea* with neuroprotective effects against CoCl<sub>2</sub> and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced SH-SY5Y cell injuries. *Archives of Pharmacol Research*, 37(3), 315-323. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0188-1>
- Joseph M. Awika, Lloyd W. Rooney, Xianli Wu, Ronald L. Prior and Cisneros-Zevallos, L. (2003). Screening Methods To Measure Antioxidant Activity of Sorghum (*Sorghum bicolor*) and Sorghum Products. <https://doi.org/10.1021/JF034790I>
- Kalt, W., Liu, Y., McDonald, J. E., Vinqvist-Tymchuk, M. R., and Fillmore, S. A. E. (2014). Anthocyanin Metabolites Are Abundant and Persistent in Human Urine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62(18), 3926-3934. <https://doi.org/10.1021/jf500107j>
- Karioti, A., Sokovic, M., Ciric, A., Koukoulitsa, C., Bilia, A. R., and Skaltsa, H. (2011).

- Antimicrobial Properties of *Quercus ilex* L. Proanthocyanidin Dimers and Simple Phenolics: Evaluation of Their Synergistic Activity with Conventional Antimicrobials and Prediction of Their Pharmacokinetic Profile. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(12), 6412-6422. <https://doi.org/10.1021/jf2011535>
- Kelebek, H., and Selli, S. (2011). Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars. *International Journal of Food Science & Technology*, 46(12), 2530-2537. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02777.x>
- Kelley, D. S., Rasooly, R., Jacob, R. A., Kader, A. A., and Mackey, B. E. (2006). Consumption of Bing Sweet Cherries Lowers Circulating Concentrations of Inflammation Markers in Healthy Men and Women. *The Journal of Nutrition*, 136(4), 981-986. <https://doi.org/10.1093/jn/136.4.981>
- Kelly W., Xianzhong W., and Liu, R., (2003). Antioxidant Activity of Apple Peels. <https://doi.org/10.1021/JF020782A>
- Kim, D.O., and Padilla-Zakour, O. I. (2006). Jam Processing Effect on Phenolics and Antioxidant Capacity in Anthocyanin-rich Fruits: Cherry, Plum, and Raspberry. *Journal of Food Science*, 69(9), S395-S400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2004.tb09956.x>
- King, R. E., Bomser, J. A., and Min, D. B. (2006). Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 5(3), 65-70. <https://doi.org/10.1111/j.1541-4337.2006.00001.x>
- Kong, J.M., Chia, L.S., Goh, N.K., Chia, T.F., and Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 64(5), 923-933. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(03\)00438-2](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(03)00438-2)
- Kosińska-Cagnazzo, A., Diering, S., Prim, D., and Andlauer, W. (2015). Identification of bioaccessible and uptaken phenolic compounds from strawberry fruits in in vitro digestion/Caco-2 absorption model. *Food Chemistry*, 170, 288-294. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2014.08.070>
- Lavelli, V., Fregapane G., and Salvador, M. D. (2006). Effect of Storage on Secoiridoid and Tocopherol Contents and Antioxidant Activity of Monovarietal Extra Virgin Olive Oils. <https://doi.org/10.1021/JF052918L>
- Li, A.N., Li, S., Zhang, Y.J., Xu, X.R., Chen, Y.M., and Li, H.B. (2014). Resources and Biological Activities of Natural Polyphenols. *Nutrients*, 6(12), 6020-6047. <https://doi.org/10.3390/nu6126020>
- Lila, M. A. (2004). Anthocyanins and Human Health: An In Vitro Investigative Approach. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2004(5), 306-313. <https://doi.org/10.1155/S111072430440401X>
- Lin, J.Y., and Tang, C.Y. (2007). Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101(1), 140-147. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2006.01.014>
- Lu, Y., Lin, H., Zhang, J., Wei, J., Sun, J., and Han, L. (2017). Sijunzi Decoction attenuates 2, 4, 6-trinitrobenzene sulfonic acid (TNBS)-induced colitis in rats and ameliorates TNBS-induced claudin-2 damage via NF-κB pathway in Caco2 cells. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 35. <https://doi.org/10.1186/s12906-016-1549-3>
- Luis, Â., Duarte, A. P., Pereira, L., and Domingues, F. (2018). Interactions between the major bioactive polyphenols of berries: effects on antioxidant properties. *European Food Research and Technology*, 244(1), 175-185. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2948-5>

- McCune, L. M., Kubota, C., Stendell-Hollis, N. R., and Thomson, C. A. (2010). Cherries and Health: A Review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51(1), 1-12. <https://doi.org/10.1080/10408390903001719>
- Meyer, V., and Wiley I. (2010). *Practical high-performance liquid chromatography*. Wiley. Retrieved from <https://www.wiley.com/en-us/Practical+High+Performance+Liquid+Chromatography%2C+5th+Edition-p-9780470682180>
- Mikulic-Petkovsek, M., Stampar, F., Veberic, R., and Sircelj, H. (2016). Wild *Prunus* Fruit Species as a Rich Source of Bioactive Compounds. *Journal of Food Science*, 81(8), C1928-C1937. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.13398>
- Miller, D. D., Schricker, B. R., Rasmussen, R. R., and Van Campen, D. (1981). An in vitro method for estimation of iron availability from meals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 34(10), 2248-2256. <https://doi.org/10.1093/ajcn/34.10.2248>
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., and Brodkorb, A. (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. *Food Funct.*, 5(6), 1113-1124. <https://doi.org/10.1039/C3FO60702J>
- Mishra, K., Ojha, H., and Chaudhury, N. K. (2012). Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH Å assay: A critical review and results. *Food Chemistry*, 130, 1036-1043. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.127>
- Mulabagal, V., Lang, G. A., DeWitt, D. L., Dalavoy, S. S., and Nair, M. G. (2009). Anthocyanin Content, Lipid Peroxidation and Cyclooxygenase Enzyme Inhibitory Activities of Sweet and Sour Cherries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1239-1246. <https://doi.org/10.1021/jf8032039>
- Narai, A., Arai, S., and Shimizu, M. (1997). Rapid decrease in transepithelial electrical resistance of human intestinal Caco-2 cell monolayers by cytotoxic membrane perturbants. *Toxicology in Vitro*, 11(4), 347-354. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(97\)00026-X](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(97)00026-X)
- Nawirska-Olszańska, A., Kolniak-Ostek, J., Oziembłowski, M., Ticha, A., Hyšpler, R., Zadak, Z., and Paprstein, F. (2017). Comparison of old cherry cultivars grown in Czech Republic by chemical composition and bioactive compounds. *Food Chemistry*, 228, 136-142. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2017.01.154>
- Perron, N. R., García, C. R., Pinzón, J. R., Chaur, M. N., and Brumaghim, J. L. (2011). Antioxidant and prooxidant effects of polyphenol compounds on copper-mediated DNA damage. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 105(5), 745-753. <https://doi.org/10.1016/J.JINORGBIO.2011.02.009>
- Phenolic Compound Biochemistry*. (2006). Dordrecht: Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-5164-7>
- Piccolella, S., Fiorentino, A., Pacifico, S., D'Abrosca, B., Uzzo, P., and Monaco, P. (2008). Antioxidant Properties of Sour Cherries (*Prunus cerasus* L.): Role of Colorless Phytochemicals from the Methanolic Extract of Ripe Fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(6), 1928-1935. <https://doi.org/10.1021/jf0734727>
- Piccolino, M., Neyton, J., and Gerschenfeld, H. M. (1984). Decrease of gap junction permeability induced by dopamine and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate in horizontal cells of turtle retina. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 4(10), 2477-88. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.04-10-02477.1984>

- Ramos, R. C. (2017). Estudo da Bioacessibilidade de Compostos Fenólicos Presentes em Extratos de *Prunus Avium* L. Após Processo Digestivo In Vitro Hospitalar e Investigação.
- Reboredo-Rodríguez, P., González-Barreiro, C., Cancho-Grande, B., Forbes-Hernández, T. Y., Gasparri, M., Afrin, S., and Battino, M. (2018). Characterization of phenolic extracts from Brava extra virgin olive oils and their cytotoxic effects on MCF-7 breast cancer cells. *Food and Chemical Toxicology*. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2018.05.026>
- Redondo, D., Arias, E., Oria, R., and Venturini, M. E. (2017). Thinned stone fruits are a source of polyphenols and antioxidant compounds. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 97(3), 902-910. <https://doi.org/10.1002/jsfa.7813>
- Rodrigo, R., Miranda, A., and Vergara, L. (2011). Modulation of endogenous antioxidant system by wine polyphenols in human disease. *Clinica Chimica Acta*, 412(5-6), 410-424. <https://doi.org/10.1016/J.CCA.2010.11.034>
- Rubió, L., Macià, A., Castell-Auví, A., Pinent, M., Blay, M. T., Ardévol, A., and Motilva, M.-J. (2014). Effect of the co-occurring olive oil and thyme extracts on the phenolic bioaccessibility and bioavailability assessed by in vitro digestion and cell models. *Food Chemistry*, 149, 277-284. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2013.10.075>
- Sambuy, Y., De Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M. L., Stammati, A., and Zucco, F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 21(1), 1-26. <https://doi.org/10.1007/s10565-005-0085-6>
- Šarić, A., Sobočanec, S., Balog, T., Kušić, B., Šverko, V., Dragović-Uzelac, V., and Marotti, T. (2009). Improved Antioxidant and Anti-inflammatory Potential in Mice Consuming Sour Cherry Juice (*Prunus Cerasus* cv. Maraska). *Plant Foods for Human Nutrition*, 64(4), 231-237. <https://doi.org/10.1007/s11130-009-0135-y>
- Satsu, H., Yokoyama, T., Ogawa, N., Fujiwara-Hatano, Y., and Shimizu, M. (2001). The changes in the neuronal PC12 and the intestinal epithelial Caco-2 cells during the coculture. The functional analysis using an in vitro coculture system. *Cytotechnology*, 35(1), 73-79. <https://doi.org/10.1023/A:1008136103927>
- Scott, R. P. W. and Raymond P. W. (1995). *Techniques and practice of chromatography*. M. Dekker. Retrieved from <https://www.crcpress.com/Techniques-and-Practice-of-Chromatography/Scott/p/book/9780824794606>
- Seeram, N. P., Momin, R. A., Nair, M. G., and Bourquin, L. D. (2001). Cyclooxygenase inhibitory and antioxidant cyanidin glycosides in cherries and berries. *Phytomedicine*, 8(5), 362-369. <https://doi.org/10.1078/0944-7113-00053>
- Serra, A. T., Duarte, R. O., Bronze, M. R., and Duarte, C. M. M. (2011). Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry*, 125(2), 318-325. <https://doi.org/10.1016/J.FOODCHEM.2010.07.088>
- Serra, A. T., Matias, A. A., Frade, R. F. M., Duarte, R. O., Feliciano, R. P., Bronze, M. R., and Duarte, C. M. M. (2010). Characterization of traditional and exotic apple varieties from Portugal. Part 2 - Antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Functional Foods*, 2(1), 46-53. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2009.12.005>
- Serrano, M., Guillén, F., Martínez-Romero, D., Castillo, S., and Valero, D., (2005). Chemical Constituents and Antioxidant Activity of Sweet Cherry at Different Ripening Stages. <https://doi.org/10.1021/JF0479160>

- Shah, P., Jogani, V., Bagchi, T., and Misra, A. (2006). Role of Caco-2 Cell Monolayers in Prediction of Intestinal Drug Absorption. *Biotechnology Progress*, 22(1), 186-198. <https://doi.org/10.1021/bp050208u>
- Sigma-Aldrich. (2013). Technical bulletin, (April), 1-6. <https://doi.org/papers3://publication/uuid/F6E783CF-E652-467C-8B28-78E88D9AB158>
- Slovensko kemijsko društvo., B., and Trebše, P. (1993). *Acta chimica Slovenica*. (Vol. 1). Slovenian Chemical Society. Retrieved from <https://repozitorij.ung.si/lzpisGradiva.php?id=1935>
- Somoza, V., Molyneux, R. J., Chen, Z.Y., Tomás-Barberán, F., and Hofmann, T. (2015). Guidelines for Research on Bioactive Constituents - A *Journal of Agricultural and Food Chemistry* Perspective. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(37), 8103-8105. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b04312>
- Stalikas, C. D. (2007). Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. *Journal of Separation Science*, 30(18), 3268-3295. <https://doi.org/10.1002/jssc.200700261>
- Taofiq, O., Calhelha, R. C., Heleno, S., Barros, L., Martins, A., Santos-Buelga, C., and Ferreira, I. C. F. R. (2015). The contribution of phenolic acids to the anti-inflammatory activity of mushrooms: Screening in phenolic extracts, individual parent molecules and synthesized glucuronated and methylated derivatives. *Food Research International*, 76, 821-827. <https://doi.org/10.1016/J.FOODRES.2015.07.044>
- Thuc, L. C., Teshima, Y., Takahashi, N., Nishio, S., Fukui, A., Kume, O., and Saikawa, T. (2012). Inhibition of Na<sup>+</sup>-H<sup>+</sup> exchange as a mechanism of rapid cardioprotection by resveratrol. *British Journal of Pharmacology*, 166(6), 1745-55. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.01877.x>
- Toydemir, G., Boyacioglu, D., Capanoglu, E., van der Meer, I. M., Tomassen, M. M. M., Hall, R. D., and Beekwilder, J. (2013). Investigating the Transport Dynamics of Anthocyanins from Unprocessed Fruit and Processed Fruit Juice from Sour Cherry (*Prunus cerasus* L.) across Intestinal Epithelial Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61(47), 11434-11441. <https://doi.org/10.1021/jf4032519>
- Verhoeckx, K., Cotter, P., López-Expósito, I., Kleiveland, C., Lea, T., Mackie, A., and Wichers, H. (Eds.). (2015). *The Impact of Food Bioactives on Health*. Cham: Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-16104-4>
- Versantvoort, C. H. M., Oomen, A. G., Van de Kamp, E., Rempelberg, C. J. M., and Sips, A. J. A. M. (2005). Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of mycotoxins from food. *Food and Chemical Toxicology*, 43(1), 31-40. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2004.08.007>
- Walsh, C. T., and Levine, R. R. (1979). Methods for the analysis of intestinal function. *Environmental Health Perspectives*, 33, 17-23. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/540616>
- Wang, C., and Zuo, Y. (2011). Ultrasound-assisted hydrolysis and gas chromatography-mass spectrometric determination of phenolic compounds in cranberry products. *Food Chemistry*, 128(2), 562-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.03.066>
- Wang, L.S., and Stoner, G. D. (2008). Anthocyanins and their role in cancer prevention. *Cancer Letters*, 269(2), 281-90. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2008.05.020>
- Wang, M., Jiang, N., Wang, Y., Jiang, D., and Feng, X. (2017). Characterization of Phenolic Compounds from Early and Late Ripening Sweet Cherries and Their Antioxidant and

Antifungal Activities. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(26), 5413-5420. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01409>

William Mullen, Amanda J. Stewart, Michael E. J. Lean, Peter Gardner, Garry G. Duthie, and Alan Crozier, (2002). Effect of Freezing and Storage on the Phenolics, Ellagitannins, Flavonoids, and Antioxidant Capacity of Red Raspberries. <https://doi.org/10.1021/JF020141F>

Yuasa, H., Matsuda, K., and Watanabe, J. (1993). Influence of Anesthetic Regimens on Intestinal Absorption in Rats. *Pharmaceutical Research*, 10(6), 884-888. <https://doi.org/10.1023/A:1018917412696>

Zgórká, G., and Kawka, S. (2001). Application of conventional UV, photodiode array (PDA) and fluorescence (FL) detection to analysis of phenolic acids in plant material and pharmaceutical preparations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 24(5-6), 1065-1072. [https://doi.org/10.1016/S0731-7085\(00\)00541-0](https://doi.org/10.1016/S0731-7085(00)00541-0)

Zhang, Y., Vareed, S. K., and Nair, M. G. (2005). Human tumor cell growth inhibition by nontoxic anthocyanidins, the pigments in fruits and vegetables. *Life Sciences*, 76(13), 1465-1472. <https://doi.org/10.1016/J.LFS.2004.08.025>

Zhao, X., Pang, L., Li, J., Song, J.L., and Qiu, L.H. (2014). Apoptosis Inducing Effects of Kuding Tea Polyphenols in Human Buccal Squamous Cell Carcinoma Cell Line BcaCD885. *Nutrients*, 6(8), 3084-3100. <https://doi.org/10.3390/nu6083084>

## Anexos

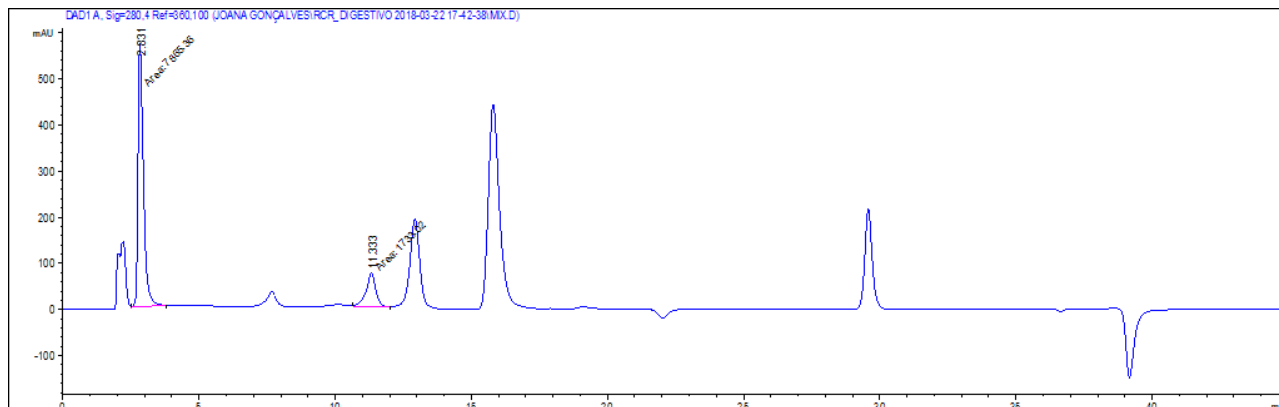


Figura 1- Cromatograma obtido para o ácido gálico (TR=2.83 min) e epicatequina (TR= 11.33 min).  $\lambda=280$  nm

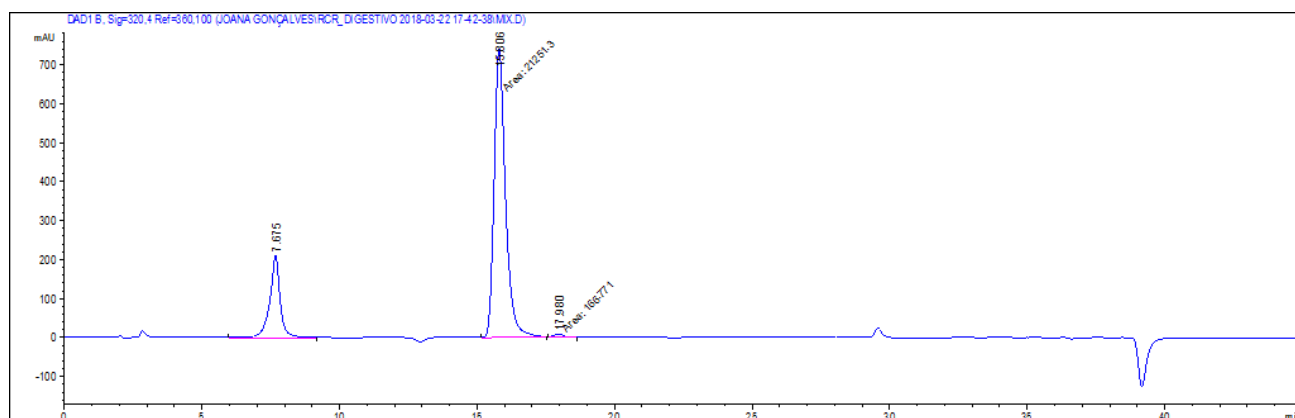


Figura 2- Cromatograma obtido para o ácido clorogénico (TR=7.68 min), quercetina-3,4'-di-O-glicosídeo (TR= 15.81 min) e ácido p-coumárico (TR= 17.98 min).  $\lambda=320$  nm

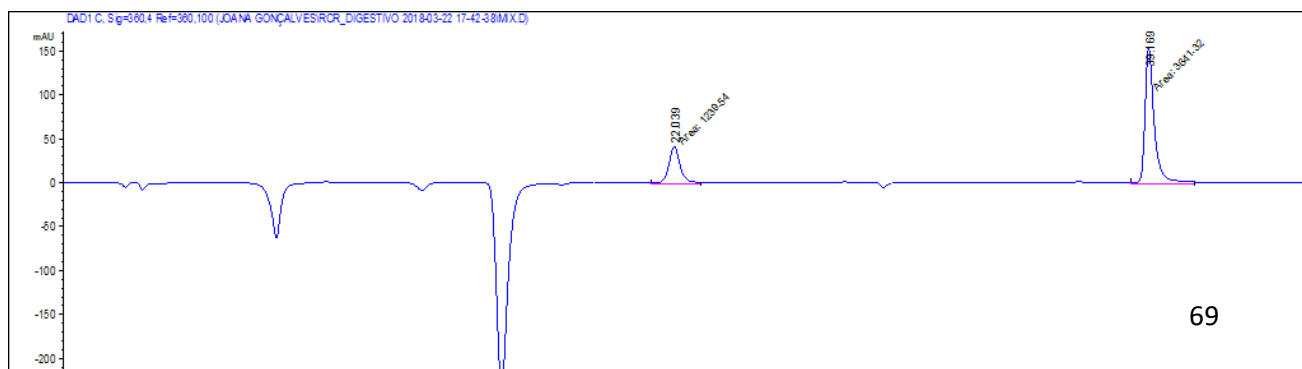


Figura 3- Cromatograma obtido para a rutina (TR=22.04 min) e quercetina (TR= 39.17min).  $\lambda=360$  nm

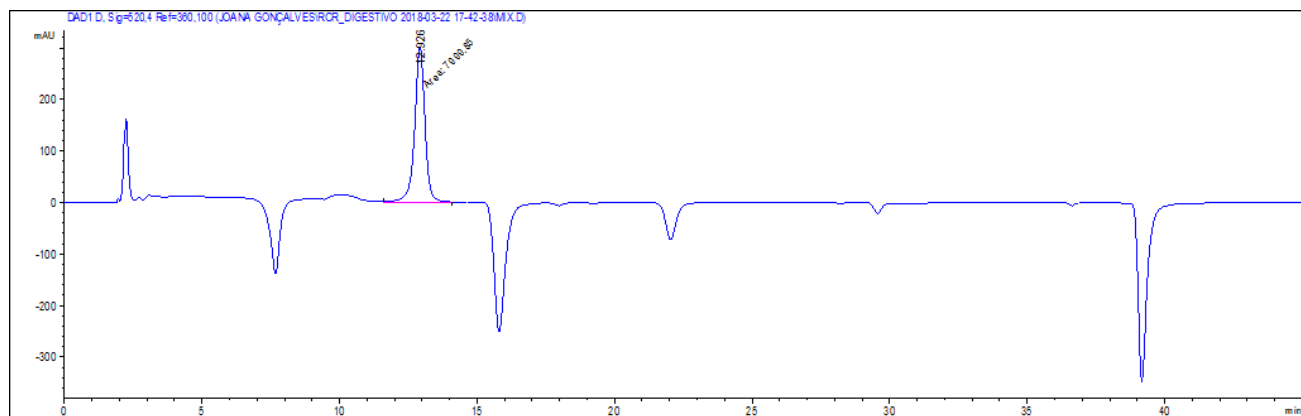


Figura 4- Cromatograma obtido para a cianidina-3-O-glicosídeo (TR=12.93 min).  $\lambda=520$  nm