



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

# **Caracterização fitoquímica e avaliação das propriedades antimicrobianas de cerejas do Fundão**

**Maria Beatriz Jerónimo Catalão**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

**Biotecnologia**

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof<sup>a</sup> Doutora Ana Paula Coelho Duarte

Coorientador: Doutora Susana Ferreira

**Covilhã, Junho de 2016**



“O que tiver de vir, virá. E nós só teremos de lidar com isso quando vier.”

Hagrid *in* “Harry Potter”

J.K.Rowling

# Agradecimentos

Antes de mais, gostaria de agradecer à Universidade da Beira Interior e ao Centro de Investigação de Ciências da Saúde por terem disponibilizado as condições necessárias ao desenvolvimento deste trabalho experimental. Gostaria também de agradecer à CerFundão por ter gentilmente cedido as cerejas que tornaram possível a execução desta dissertação.

Acima de tudo gostaria de agradecer a todos os que possibilitaram a realização desta tese:

- À Prof<sup>a</sup> Doutora Ana Paula Duarte e à Doutora Susana Ferreira, as minhas orientadoras nesta dissertação, por toda a disponibilidade, apoio, atenção, ajuda e por todos os ensinamentos transmitidos ao longo deste ano.
- À Prof<sup>a</sup> Doutora Maria Emília Amaral pela disponibilidade e ajuda prestada.
- Ao meu colega de laboratório Gonçalo Silva, que também trabalha com cerejas, e me animou quando necessitei.
- À minha colega de laboratório Mariana Marques e Adriana Oliveira, que ainda me deve uma mousse de chocolate, por todo apoio, amizade e carinho.

Por último, mas não menos importante, queria agradecer à minha família, a minha mãe e irmã. Queria muito agradecer às duas por me aturarem: os amos, o stress, os nervos, as lágrimas e sorrisos e sobretudo o mau feitio, sem vocês este trabalho não seria de todo possível. Obrigada, vocês estiveram sempre lá por mim!

A todos os que me ajudaram nesta etapa da minha vida e na elaboração deste trabalho, o meu muito OBRIGADA!



# Resumo

A crescente resistência antimicrobiana e a rejeição por parte da população de compostos químicos e sintéticos deu origem a uma procura de novos compostos. Estes deveriam ser de preferência naturais, cujas características organolépticas e químicas se juntassem a possíveis propriedades antimicrobianas para futuras aplicações na área alimentar e farmacêutica. Assim, surgiu uma nova área de interesse científico na procura de novos compostos com estas características em plantas e frutos. As cerejas são um fruto cujos componentes químicos parecem reunir todas estas características, nomeadamente os compostos fenólicos, os quais para além de serem fortes antioxidantes e portanto benéficos para a saúde, poderão ser considerados potenciais antimicrobianos.

Assim, o objetivo principal desta dissertação passa pela obtenção, caracterização fitoquímica e avaliação biológica de extratos de seis variedades de cereja do Fundão, nomeadamente Brooks, Earlise, Primulat, Summit, Sweetheart e Saco (1ª Colheita e Colheita Tardia), totalizando sete amostras. Para a obtenção dos extratos ricos em compostos fenólicos foi utilizada uma extração convencional usando o metanol como solvente. A caracterização química foi realizada utilizando métodos colorimétricos - método de Folin-Ciocalteu para os fenóis totais, método colorimétrico em meio alcalino para os flavonóides totais, método de pH diferencial para as antocianinas e método do ácido dinitrosalicílico para os açúcares redutores, presentes nos extratos de cerejas. A avaliação biológica teve como base a determinação das atividades antioxidante e antimicrobiana. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método colorimétrico de DPPH e a atividade antimicrobiana foi estimada através de metodologias que avaliaram a inibição de crescimento de vários tipos de microrganismos (bactérias Gram positivas e negativas e leveduras), a potenciação da atividade da tetraciclina, o papel das bombas de efluxo na resistência ao extrato de cereja e, também, a inibição de diversos mecanismos de virulência (*quorum sensing*, produção de piocianina e pioverdina, motilidade de tipo “*swarming*”, e formação de biofilmes).

A caracterização dos compostos fitoquímicos presentes nas cerejas permitiu observar que as cerejas têm na sua composição um conteúdo em compostos que varia consoante a variedade de cereja. Quanto ao conteúdo de compostos fenólicos, a variedade de cereja Saco Colheita Tardia contém um maior teor de fenóis (274,52 mg GAE/100 g de cereja fresca) e a variedade Earlise tem um menor teor (54,87 mg GAE/100 g de cereja fresca). Para os flavonóides, também a Saco Colheita Tardia tem um teor mais elevado destes compostos (20,79 mg QE/100 g de cereja fresca), enquanto a Sweetheart é a variedade que tem menos flavonóides (6,00 mg QE/100 g de cereja fresca). Relativamente às antocianinas, mais uma vez a variedade Saco Colheita Tardia é a que tem um teor (73,05 mg Cy-3-glc/100 g de cereja fresca), destes compostos, mais elevado, sendo que a Earlise é a que tem o menor teor (9,14 mg Cy-3-glc/100 g de cereja fresca). Nestes compostos a variedade de Saco Colheita Tardia foi

a que obteve os maiores valores. Nos açúcares redutores, a variedade de cereja Sweetheart é a variedade de cereja com mais açúcares (161,66 g/kg de cereja fresca), enquanto a Earlise é a que tem menos (78,907 g/kg de cereja fresca).

Na avaliação da atividade biológica, os extratos de cereja apresentaram uma elevada atividade antioxidante com valores próximos do padrão Trolox, especialmente no caso da variedade Saco Colheita Tardia (EC50= 42,340 mg/L). Ao nível da atividade antimicrobiana, como os extratos de cereja contêm muitos compostos interferentes, mesmo utilizando um extrato enriquecido em compostos fenólicos, os resultados nesta área não foram muito satisfatórios, com o extrato de cereja conseguindo inibir o microrganismo *K. pneumoniae* e baixar a concentração mínima inibitória do antibiótico tetraciclina num efeito potenciador do antibiótico. No entanto, não se observou uma capacidade de inibição dos factores de virulência estudados. Assim, pode concluir-se que apesar de o extrato de cereja testado não apresentar atividade antimicrobiana significativa, os extratos de cereja testados apresentam um forte poder antioxidante, sendo esta a sua principal característica.

**Palavras-chave** - Cereja; extração; compostos fenólicos; flavonóides; antocianinas; atividade antioxidante; antimicrobianos.



# Abstract

The increasing antimicrobial resistance and rejection of chemical and synthetic compounds by the population, gave rise to a search for new compounds. These should preferably be natural compounds, which organoleptic and chemical characteristics should be connected with potential antimicrobial properties for future food and pharmaceutical applications. Therefore, a new area of scientific interest arises for the search for new compounds with these characteristics in plants and fruits. Sweet cherries are fruits which chemical components probably combine all of these features, in particular the phenolic compounds which in addition to being strong antioxidants, and therefore beneficial to health, may be considered as potential antimicrobial agents.

Thus, the main objective of this work involves the obtainment, phytochemical characterization and biological evaluation of extracts from six different cultivars of sweet cherries from Fundão region, including Brooks, Earlise, Primulat, Summit, Sweetheart and Saco (First Harvest and Late Harvest), comprising seven samples. To obtain extracts rich in phenolic compounds, it was used a conventional extraction using methanol as solvent. The chemical characterization was performed using colorimetric methods - the Folin-Ciocalteu method for total phenols, a colorimetric method in alkaline medium for total flavonoids determination, a pH differential method for anthocyanins quantification, and the dinitrosalicylic colorimetric method to the reducing sugar determination in sweet cherry extracts. The biological evaluation was performed by determining the antioxidant and antimicrobial activities. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH colorimetric method. The antimicrobial activity was estimated by different approaches evaluating the growth inhibition of various types of microorganisms (Gram positive and Gram negative bacteria and yeasts), the potentiation of tetracycline action, the role of efflux pumps in the cherry extract resistance, and also the inhibition of several virulence mechanisms (quorum sensing, pyoverdine and pyocyanin production, swarming motility and biofilm formation).

The characterization of the phytochemical composition of cherries allowed to observe that these fruits have a content of compounds dependent on the different cherry cultivars. As for the content of phenolic compounds, the variety of cherry Saco Late Harvest contains a higher content of phenols (274.52 mg GAE/100 g of fresh sweet cherry) and Earlise variety has a lower content (54.87 mg GAE/100 g of fresh sweet cherry). For flavonoids, Saco Late Harvest has also a higher content (20.79 mg QE/100 g of fresh sweet cherry), while Sweetheart is the cultivar that has less flavonoids (6.00 mg QE/100 g of fresh sweet cherry). Concerning the anthocyanins determination, Saco Late Harvest had again the higher content of these compounds (73.05 mg Cy-3-glc/100 g of fresh sweet cherry), with the Earlise being the one that had the lowest (9.14 mg Cy-3-glc/100 g of fresh sweet cherry). Considering these compounds, the cultivar of Saco Late Harvest was the one with the highest values. Regarding reducing

sugars, the variety Sweetheart cherry was the variety of cherry with more sugars (161.66 g/ kg of fresh sweet cherry), while Earlise was the one with less content (78.91 g/ kg of fresh sweet cherry).

With respect to the evaluation of biological activity, cherry extracts showed a high antioxidant activity when compared with the positive control, trolox, especially in the case of Saco Late Harvest (EC50 = 42.340 mg / L). Regarding antimicrobial activity, as cherry extracts contain many interfering compounds, even when using an enriched extract of phenolic compounds, results were not very satisfactory, with cherry extract managing to inhibit *K. pneumoniae* and lowering the minimum inhibitory concentration of tetracycline antibiotic, in a potentiating effect of the antibiotic. However, there was not observed an inhibition ability of the studied virulence factors. Accordingly, it can be concluded that although the cherry extract tested did not showed a significant antimicrobial activity, the tested cherry extracts have a strong antioxidant power, which is its main characteristic.

**Keywords** - Sweet cherry; extraction; phenolic compounds; flavonoids; anthocyanins; antimicrobials.

# Abreviaturas

<b>AIP</b>	péptidos autoinduzidos
<b>AHLs</b>	homoserinas N-acil lactonas
<b>CMI</b>	concentração mínima inibitória
<b>DPPH</b>	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DNS</b>	ácido dinitrossalicílico
<b>FRAP</b>	método do poder antioxidante de redução férrico
<b>HPLC</b>	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>MHB</b>	<i>Mueller-Hinton Broth</i>
<b>ROS/RNS</b>	espécies reativas de oxigénio e/ou azoto
<b>SDA</b>	Sabourad Dextrose Agar
<b>SPE</b>	<i>Solid Phase Extraction</i>
<b>TSA</b>	<i>Tryptone Soya Agar</i>
<b>UFC</b>	unidades formadoras de colónias



# Índice

1. Introdução .....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	3
2.1 Constituintes das Cerejas.....	4
2.2. Efeitos benéficos dos compostos fenólicos .....	7
2.2.1. Atividade antioxidante .....	8
2.2.2. Atividade anti-inflamatória .....	8
2.2.3. Atividade anticancerígena .....	9
2.2.4. Atividade antimicrobiana .....	9
2.3. Caracterização dos compostos Fenólicos .....	10
2.3.1. Extração.....	10
2.3.2. Purificação.....	12
2.3.3. Caracterização química .....	13
2.3.4. Determinação da atividade biológica .....	16
2.4. Atividade antimicrobiana.....	18
2.4.1. Resistência antimicrobiana .....	18
2.4.2. Mecanismos de virulência .....	21
3.1. Preparação das amostras de cerejas .....	27
3.2. Extração .....	27
3.3. Purificação cromatográfica dos extratos .....	28
3.4. Caracterização química dos extratos.....	30
3.4.1. Quantificação dos fenóis totais .....	30
3.4.2. Quantificação dos flavonóides totais .....	31
3.4.3. Quantificação das antocianinas .....	32
3.4.4. Quantificação dos açúcares redutores totais .....	33
3.5. Determinação da atividade biológica.....	34
3.5.1. Atividade antioxidante .....	34
3.5.2. Atividade antimicrobiana .....	35
4. Resultados e Discussão .....	43
4.1. Caracterização Química.....	43
4.1.1. Fenóis Totais .....	43
4.1.2. Flavonóides Totais.....	44
4.1.3. Antocianinas Totais .....	45
4.1.4. Açúcares Redutores .....	46
4.2. Atividade Biológica .....	47

4.2.1. Atividade antioxidante .....	47
4.3. Atividade Antimicrobiana.....	58
4.3.1. Concentração mínima inibitória .....	58
4.3.2. Ensaios avaliação da potenciação da atividade de um antibiótico .....	60
4.3.3. Avaliação do papel de bombas de efluxo na resistência ao extrato de cereja .....	61
4.3.4. Avaliação da inibição do processo de <i>Quorum-sensing</i> (QS) .....	62
4.3.5. Avaliação da produção de piocianina e de pioverdina .....	65
4.3.6. Avaliação da influência na motilidade de tipo “swarming” .....	67
4.3.7. Formação de biofilmes .....	68
5. Conclusões e perspectivas futuras .....	71
6. Referências .....	73
7. Anexos .....	80
7.1. Purificação .....	80
7.2. Atividade antioxidante .....	83
7.2.1. Padrões .....	83
7.2.2. Sweetheart .....	85
7.2.3. Earlise .....	86
7.2.4. Summit .....	87
7.2.5. Brooks .....	88
7.2.6. Saco 1 <sup>a</sup> Colheita .....	89
7.2.7. Primulat .....	90



# 1. Introdução

Atualmente existe um aumento do consumo de alimentos saudáveis, em particular fruta e legumes, o qual está diretamente correlacionado com a ideia de que alimentos saudáveis diminuem a incidência de doenças e prolongam a qualidade de vida.

Esta ideia fez com que a população mundial começasse a rejeitar os componentes sintéticos utilizados a nível alimentar, nomeadamente os corantes e conservantes, os quais eram utilizados para aumentar o tempo de vida dos alimentos e simultaneamente combater microrganismos que provocam infeções na população.

A interligação destes factores contribuiu para uma crescente necessidade do estudo de componentes naturais alternativos e substitutos destes componentes sintéticos. Para além deste facto, também a crescente tendência de resistência por parte de microrganismos aos antibióticos, faz com a área dos compostos naturais se torne uma área de grande interesse científico.

A Cereja, um fruto bastante apreciado pelo seu tamanho, cor, sabor e reduzido índice calórico, pode apresentar-se como um fruto cujos constituintes fitoquímicos são potenciais alternativas aos compostos sintéticos. Na bibliografia associada a este fruto, são diversos os estudos existentes acerca dos seus constituintes bioativos, os quais têm demonstrado elevado poder antioxidante. Estes constituintes são metabolitos secundários que se encontram normalmente nas plantas e frutos e estão envolvidos, entre outros, nos mecanismos das plantas contra agentes patogénicos.

Assim, o objetivo deste trabalho consiste na caracterização fitoquímica, bem como na avaliação das propriedades antioxidantes e antimicrobianas de 6 variedades de cereja do Fundão.

Numa primeira fase, foram extraídos os compostos bioativos através de um método extrativo convencional. Posteriormente, procedeu-se à caracterização dos extratos obtidos através de uma quantificação de fenóis totais, flavonóides totais, antocianinas e açúcares redutores. Para a quantificação de fenóis totais foi utilizado um método colorimétrico, assim como para os flavonóides totais e açúcares redutores. Para a determinação das antocianinas usou-se também um método colorimétrico, mas com uma técnica de pH diferencial.

Efectuada a caracterização fitoquímica das seis variedades de cereja, procedeu-se ao estudo da actividade antioxidante e antimicrobiana. Inicialmente realizou-se a purificação do extrato de cereja, para a remoção dos açúcares presentes e para tal foram utilizadas colunas cromatográficas. Quanto à quantificação da atividade antioxidante dos extratos, foi efetuada pelo método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

Para a avaliação das propriedades antimicrobianas foram realizados testes de inibição de crescimento (determinação da concentração mínima inibitória) para bactérias Gram positivas e negativas e leveduras, assim como testes de inibição de fatores de virulência.

Esta dissertação, onde se sintetizam e apresentam os resultados experimentais obtidos, em todas as etapas descritas anteriormente, está organizada em 4 capítulos.

No segundo capítulo é efetuada uma revisão bibliográfica, onde se descrevem alguns dos trabalhos já realizados com cerejas, sendo que são descritos aspetos relativos à sua produção, aos seus componentes químicos, como são extraídos e os métodos utilizados para extração, caracterização e os métodos usados para avaliar a atividade antimicrobiana.

No 3º capítulo, apresenta-se a uma descrição pormenorizada dos materiais e métodos utilizados, onde estão incluídos os equipamentos e os reagentes, bem como a matéria-prima. Quanto aos resultados finais, estão descritos no capítulo 4, bem como a sua discussão.

No último capítulo, são apresentadas as conclusões obtidas e são enumeradas algumas propostas de trabalho futuro.

## 2.Revisão Bibliográfica

A procura por alimentos naturais, seguros e funcionais de forma a satisfazer as exigências dos consumidores, tem apresentado uma tendência crescente. Assim, têm sido cada vez mais investigados compostos naturais com o intuito de substituir os aditivos e conservantes químicos. Uma boa fonte destes compostos são as plantas e os frutos. Estes contêm uma diversidade química de compostos cujas propriedades biológicas, antioxidantes e antimicrobianas, entre outras, os tornam interessantes e alvo de estudo. Os polifenóis são alguns destes compostos encontrados em plantas e frutos, os quais apresentam bioatividade e estão envolvidos nos mecanismos de defesa contra agentes patogénicos e stress oxidativo (Demirdöven, A. et al, 2015; Nohynck, L.J. et al, 2006).

Segundo dados do Instituto Nacional de Estatística (INE), o consumo de frutos em Portugal entre 2013 e 2014 rondou os 111,5 kg/hab (INE, 2013-2014). De entre todos os frutos, as cerejas são bastante apreciadas devido à sua cor atrativa, doçura e tamanho sendo a sua aceitação dependente da razão entre a doçura e acidez do fruto. Uma característica importante deste fruto encontra-se relacionada com o facto de as cerejas possuírem atividade antioxidante, o que potencia os seus efeitos benéficos na saúde (Ferretti, G. et al, 2010).

As cerejas pertencem à família *Rosaceae*, à subfamília *Prunoideae* e ao género *Prunus*, existindo várias espécies de cereja (Ferretti, G. et al, 2010). De entre as várias espécies de cereja a mais consumida pelo seu sabor e cor é a cereja de nome científico *Prunus avium* (Ferretti, G. et al, 2010).

As cerejas são produzidas um pouco por todo o mundo, sendo que crescem preferencialmente em climas temperados e possuem um curto prazo de validade, entre 7 a 14 dias, devido ao facto de armazenarem pouca quantidade de amido (Habib, M. et al, 2015). As cerejas são produzidas em mais de 40 países, sendo a Turquia o principal produtor, seguido dos EUA, Irão, Itália, Espanha e Áustria, com a Europa sendo responsável por cerca de 40 % do total de produção (Hayaloglu, A. A. e Demir, N., 2015; Habib, M. et al, 2015). Em Portugal, as cerejas são produzidas entre os meses de abril e início de julho, sendo que a maior produção de cereja encontra-se na zona da Beira Interior, onde são produzidas cerca de 15 toneladas por ano (Dias, C., 2012; Serra, A. T. et al, 2011). A zona da Beira Interior onde existe a produção mais elevada é a Cova da Beira e os maiores produtores são as cidades do Fundão, Covilhã e Belmonte, onde são produzidas diversas variedades de cereja, existindo uma única variedade regional, a “Saco” (Serra, A. T. et al, 2011). A produção deste fruto tem apresentado um grande crescimento que vai de encontro à procura por parte do público.

## 2.1 Constituintes das Cerejas

A cereja é um fruto bastante apreciado pelas suas características, consumido preferencialmente fresco, mas também processado em geleias, sumos, doces, xaropes e como fruto desidratado (Hayaloglu, A. A. e Demir, N., 2015). Apresenta uma baixa quantidade de hidratos de carbono, alto teor em água, baixo índice glicémico, sendo também uma fonte de vitaminas e minerais. As cerejas são usadas não só como alimento, mas, na medicina tradicional, é também usado o pé de cereja através de infusões como sedativo, devido ao seu efeito calmante e relaxante, diurético e drenante (Hanbali, L. B. et al, 2013; Bastos, C. et al; 2014).

Este fruto tem muitos nutrientes, vitaminas e fibras (tabela 1), ácidos orgânicos, mas também alguns açúcares, apresentando poucas calorias, o que o torna muito atrativo num mundo cada vez mais preocupado com a saúde (Ferretti, G. et al, 2010; McCune, L. M. et al, 2011). Em relação aos ácidos orgânicos, estes variam entre 3,67-8,66 g/kg de cereja fresca (Habib, M. et al, 2015). As cerejas contêm ainda minerais, tais como cálcio (14mg/100g), magnésio (10mg/100g), fósforo (20mg/100g) e potássio (200mg/100g) (Ferretti, G. et al, 2010).

Tabela 1 - Vitaminas presentes em cerejas (*Prunus avium*) – adaptada de Ferretti, G. et al, 2010

	Quantidade/100g de cerejas
Vitamina C	7 mg
Niacina	0,2mg
Ácido Pantoténico	0,2mg
Vitamina E	0,1mg
Vitamina K	2,1µg
B - caroteno	38µg
Luteína+Zeaxantina	85µg

Além destes compostos, as cerejas também possuem diferentes componentes fenólicos em quantidades interessantes, que contribuem para as qualidades sensoriais e organoléticas inerentes a este fruto, mas também o tornam um fruto com propriedades benéficas para a saúde. Tal deve-se ao facto de influenciarem a atividade biológica, tendo a potencialidade de prevenir o cancro, mas também reduzir o risco de doenças cardiovasculares, diabetes e doenças inflamatórias (McCune, L. M. et al, 2011; Ferretti, G. et al, 2010).

As propriedades apresentadas pelos compostos fenólicos devem-se ao facto de eles conseguirem atuar ao nível do stress oxidativo e inflamação, regular os níveis de glucose e inibir a produção de ácido úrico. A concentração destes componentes pode ser afetada por diversos fatores como o clima, o momento de colheita, o processamento, o armazenamento e transporte

(McCune, L. M. et al, 2011). A temperatura, luz e maturação afetam o conteúdo e estabilidade dos fitoquímicos, mas também o valor nutricional (Ferretti, G. et al, 2010).

Por exemplo, quanto maior a quantidade de luz, maior a quantidade de ácido ascórbico, influenciando a razão doçura/acidez, por sua vez as diferenças de temperatura afetam a quantidade de compostos fenólicos (Ferretti, G. et al, 2010).

Quanto ao armazenamento e transporte, se prolongados, podem levar ao aumento do metabolismo fermentativo de certos fungos levando à formação de alguns cheiros devidos ao etanol e acetaldeído derivados do metabolismo, mas também à redução de firmeza do fruto (Habib, M. et al, 2015).

Assim, de entre os componentes bioativos encontrados nas cerejas destacam-se os compostos fenólicos, os quais se dividem em vários subgrupos, salientando-se dois deles: os ácidos fenólicos e os flavonóides, dado que neste fruto são os compostos que estão presentes em maior quantidade (McCune, L. M. et al, 2011).

Nos ácidos fenólicos conhecem-se duas classes, os derivados do ácido benzoico e os derivados do ácido cinâmico (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010). Nas cerejas, o principal constituinte dos ácidos fenólicos é o ácido hidroxicinâmico, representando cerca de 40 % do total de ácidos fenólicos (McCune, L. M. et al, 2011). Estes estão presentes nas cerejas numa elevada proporção e têm elevada atividade antioxidante, inibem a oxidação de proteínas de baixa densidade, o avanço de tumores e bloqueiam a capacidade mutagénica de certos compostos (Habib, M. et al, 2015; McCune, L. M. et al, 2011).

Todavia, estes componentes dependem fortemente da sua biodisponibilidade, sendo que para poderem ser absorvidos terão que ser clivados por esterases, ficando assim sobre a forma de ácidos livres (McCune, L. M. et al, 2011).

Os flavonóides são os polifenóis mais presentes na nossa dieta, existindo mais de 4000 flavonóides conhecidos, separando-se em 6 subgrupos, os quais variam no estado de oxidação do anel central (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010; Puupponen-Pimiä, R. et al, 2001). Esta variação na estrutura ocorre devido ao grau de hidroxilação, metilação e glicosilação que apresentam (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010). Destes subgrupos, na cereja destacam-se dois: as antocianinas (fig.1), cujos grupos R1 e R2 podem ser átomos de hidrogénio ou grupos hidroxilo ou metoxilo, sendo que os grupos R3 apenas podem ser átomos de hidrogénio os açúcares, e os flavonóis (fig.2). Os flavonóides são potentes antioxidantes, quelantes de metais e sequestrantes de radicais livres. Para além desta característica, podem inibir a peroxidação lipídica e possuem capacidade anti-inflamatória, antialérgica, anti-carcinogénica e antimicrobiana (Puupponen-Pimiä, R. et al, 2001).

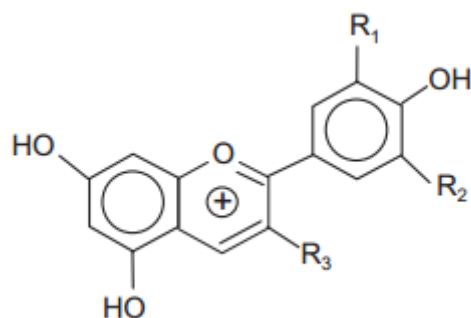


Figura 1 - Estrutura base das antocianinas - adaptada de Puupponenn-Pimiä, R. et al, 2001

As antocianinas contém os compostos responsáveis pela cor, ou seja, quanto maior for a percentagem destes compostos, mais avermelhada será a cereja (Hosseinian, F. S. et al, 2008). Estas são compostos lábeis e facilmente oxidados, e normalmente estão ligados a outros compostos, encontrando-se normalmente na forma glicosilada ligados a açúcares (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010). As antocianinas são o maior grupo de pigmentos naturais solúveis em água, fornecendo cor a vários tipos de fruta (Hosseinian, F. S. et al, 2008). Os principais compostos deste subgrupo são a cianidina, a pelargonidina, a delfinidina, a peodinidina e a malvidina, os quais têm uma capacidade antioxidante considerável, pois além de captarem radicais livres também conseguem ligar-se a metais pesados como ferro, zinco e cobre, mas também induzem enzimas antioxidantes como a glutathione-S-transferase e a superóxido dismutase, cruciais no stress oxidativo (Hosseinian, F. S. et al, 2008).

No caso das cerejas, as antocianinas são o principal antioxidante podendo ser encontradas em diferentes partes do fruto, no entanto estão mais concentradas na pele (Hanbali, L. B. et al, 2013; McCune, L. M. et al, 2011). Quanto à quantidade relativa destes compostos, esta pode variar consoante a variedade de cereja, no entanto, podem ser encontradas num intervalo de concentração de 2-243mg/100g de cereja, tendo como base a antocianina padrão a cianidina 3-glicosídeo (Habib, M. et al, 2015).

Estes compostos podem ser aplicados em produtos alimentares, como substitutos dos corantes alimentares, no entanto, a sua aplicação não é fácil, pois têm baixa estabilidade à luz, ao pH, a enzimas e à temperatura. Contudo, apresentam grandes vantagens, pois não possuem efeitos adversos para a saúde, ao contrário dos corantes sintéticos e acrescentam valor à imagem do produto (Teixeira, L. N. et al, 2008).

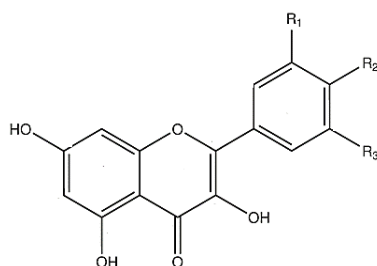


Figura 2 - Estrutura base dos flavonóis - adaptado de Souza, G.L.C. de et al, 2016

No grupo dos flavonóis (fig.2), cujos grupos R variam entre hidrogénio e grupos hidroxilo para formar os vários flavonóis, o principal composto, pois está mais vezes presente, é a quercetina.

Este composto é o que apresenta a maior atividade antioxidante devido à sua estrutura única de catecol com dois grupos hidroxilo próximos (fig.3). Isto significa que tem um papel bastante activo no stress oxidativo, pois tem a capacidade de captar radicais livres, nomeadamente reduzindo as espécies reactivas de oxigénio (McCune, L. M. et al, 2011).

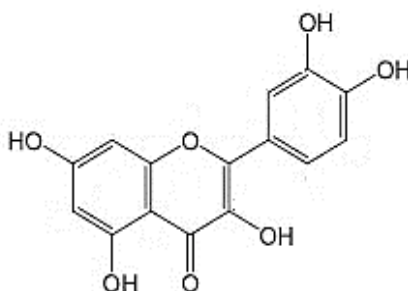


Figura 3 - Estrutura química de catecol da quercetina - adaptada de Hamiunik, Charles W. I. et al; 2012

## 2.2. Efeitos benéficos dos compostos fenólicos

Como referido, os compostos fenólicos das cerejas conseguem exercer um efeito protetor contra o desenvolvimento de algumas doenças humanas, tais como doenças cardiovasculares, diabetes e cancro. Estes efeitos devem-se à atividade antioxidante, anti-inflamatória e anticancerígena que estes componentes possuem (Ferretti, G. et al, 2010). Devido aos compostos fenólicos, presentes na cereja, é ainda possível que estas possuam atividade antimicrobiana. Esta possibilidade é estabelecida com base no facto de os compostos fenólicos fazerem parte dos mecanismos de defesa da planta e frutos contra agentes patogénicos (Nohynck, L.J. et al; 2006).

### **2.2.1. Atividade antioxidante**

A atividade antioxidante nas cerejas já foi bastante investigada utilizando diversas metodologias. Dos estudos já realizados ficou demonstrado que a antocianina, cianidina-3-glucosídeo, é o composto que demonstra maior atividade, no entanto também outros compostos fenólicos têm atividade antioxidante (Ferretti, G. et al, 2010).

O stress oxidativo induzido pela luz ultravioleta, leva à formação de ROS/RNS capazes de oxidar lípidos proteína ou DNA, que levam a formação de produtos oxidados, como lípidos hidroperóxidos, ou proteínas carbonilos, que estão envolvidos em problemas de pele como cancro na pele (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010).

Os compostos fenólicos conseguem exercer uma grande atividade quimiopreventiva através da redução da produção de radicais livres, atuando como metais de transição, com extratos com compostos fenólicos mostrando que reduzem o dano oxidativo pela luz ultravioleta na pele. Compostos fenólicos purificados, como as antocianinas, demonstraram inibir o stress oxidativo e o dano celular protegendo os queratinócitos (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010). Assim, é sugerido que existe uma relação entre a atividade antioxidante e anticancerígena dos compostos fenólicos.

Contudo, a atividade antioxidante das cerejas pode ser afetada pelo processo de colheita, armazenamento e exposição a vários fatores, uma vez que estes afetam os componentes responsáveis pela atividade antioxidante (Ferretti, G. et al, 2010).

### **2.2.2. Atividade anti-inflamatória**

Relativamente à atividade anti-inflamatória das cerejas, a bibliografia demonstra que estas conseguem inibir vias inflamatórias.

Nomeadamente, um estudo refere que os níveis de proteína C-reativa e óxido nítrico diminuem com a ingestão de cerejas ao longo de 28 dias, sendo os níveis elevados de proteína C-reativa um dos maiores indicadores de processo inflamatório e que podem levar a riscos de doenças cardiovasculares. O aumento de óxido nítrico também contribui para o stress oxidativo e as lesões nos tecidos para vários tipos de doenças. Foi demonstrado *in vitro* que as antocianinas conseguem inibir a produção deste óxido e outros fatores pro-inflamatórios, estando diretamente relacionadas com a atividade anti-inflamatória (Ferretti, G. et al, 2010).

Os compostos fenólicos das cerejas conseguem ainda inibir a atividade da enzima ciclooxigenase II. Esta enzima é uma enzima pro-inflamatória envolvida em vários processos

como a inflamação, carcinogénese, apoptose, proliferação celular e angiogénese (Ferretti, G. et al, 2010).

A obesidade é uma doença associada à inflamação, tendo sido demonstrado que dietas ricas em cerejas conseguem diminuir a inflamação dos tecidos e plasma, mas também conseguem reduzir os níveis de alguns fatores que estão associados à diminuição dos níveis séricos de glucose, triglicéridos e colesterol (Ferretti, G. et al, 2010).

### **2.2.3. Atividade anticancerígena**

Os componentes anticancerígenos das cerejas são as fibras, as antocianinas, a vitamina C e os carotenóides, sendo os principais as antocianinas, em particular a cianidina (McCune, L. M. et al, 2011).

Vários estudos *in vitro* demonstram que as antocianinas conseguem estimular a expressão de enzimas como a glutathione redutase, a glutathione peroxidase e NAD(P)H: quinone reductase envolvidas no stress oxidativo. As antocianinas conseguem inibir a mutagénese de toxinas ambientais e fatores carcinogénicos, induzindo a apoptose celular e diferenciação, e reduzindo a proliferação celular (Ferretti, G. et al, 2010).

Estudos *in vitro* demonstram que as antocianinas das cerejas conseguem reduzir a proliferação de células humanas de cancro de colon em cultura (Ferretti, G. et al, 2010).

### **2.2.4. Atividade antimicrobiana**

Os frutos e bagas contêm uma elevada variedade de compostos fenólicos, os quais estão localizados em tecidos relacionados com a função natural dos frutos de proteção contra o stress ambiental e contra agentes patogénicos. Por este motivo, a atividade antimicrobiana destes compostos tem sido intensivamente investigada com o intuito de aplicação humana, a nível terapêutico ou alimentar (Nohynck, L.J. et al, 2006).

Alguns estudos referem estas propriedades antimicrobianas, nomeadamente relativas ao arando que consegue inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes*, e suprime a adesão e o crescimento de *Helicobacter pylori* na mucosa gástrica humana, existindo mesmo resultados promissores relativos aos compostos fenólicos do arando na erradicação de *Helicobacter pylori*. Também a groselha demonstrou capacidade de inibição deste microrganismo na mucosa gástrica humana (Nohynck, L.J. et al, 2006).

Existem ainda estudos com framboesas e morangos, ricos em compostos fenólicos, cujos extratos inibem o crescimento de agentes patogénicos do trato gastrointestinal humano, nomeadamente *Staphylococcus* e *Salmonella*. É de esperar que esta atividade antimicrobiana se deva a sinergismos e mecanismos entre vários compostos, com foco nos compostos fenólicos (Nohynck, L.J. et al, 2006; Burdulis, D. et al, 2009).

Assim é de esperar que as cerejas, sobretudo extratos deste fruto enriquecidos em compostos fenólicos, possuam algum tipo de atividade antimicrobiana.

## **2.3. Caracterização dos compostos Fenólicos**

Para o estudo dos compostos fenólicos dos extratos de cerejas são necessárias várias etapas, desde a preparação do fruto, à extração, caracterização química e estudos *in vitro* da atividade biológica, nomeadamente as atividades antioxidante e antimicrobiana.

### **2.3.1. Extração**

A obtenção dos componentes bioativos das cerejas é baseada em metodologias de extração que devem ser adequadas ao tipo de compostos que se pretende extrair, tendo em conta a sua suscetibilidade, bem como à quantidade e qualidade dos mesmos (Herrera, M. C. e Castro, M. D. L. de, 2005). Os extratos serão a base para realizar todos os ensaios.

A seleção do método de extração dos compostos bioativos carece de cuidados específicos, uma vez que os compostos fenólicos são facilmente oxidados e são degradados rapidamente pela luz, já as antocianinas degradam-se com a temperatura, a valores acima dos 35 °C (Herrera, M. C. e Castro, M. D. L. de, 2005). A extração de compostos bioativos depende assim de vários fatores tais como a temperatura, o solvente utilizado e a sua concentração, a pressão, o tempo de extração e a razão sólido/solvente (Oncea, S. et al; 2013). Quanto à escolha do solvente, os mais utilizados são o metanol e o etanol, devido à sua eficiência de extração quando se trata de compostos fenólicos, contudo para processos nutracêuticos, a escolha recai sobre o etanol (Routray, W. e Orsat, V., 2014).

Relativamente à extração propriamente dita existem essencialmente duas tipologias de métodos: os convencionais e os não-convencionais.

De entre os métodos convencionais destacam-se pela sua utilização a extração com Soxhlet, a maceração e a hidrodestilação. Contudo estes métodos, com exceção da hidrodestilação que apenas consome água e a recupera, utilizam elevadas quantidades de

solvente, tornando-se prejudiciais para o meio ambiente (Bandar, H. et al, 2013). Assim, estes métodos acabaram por ser substituídos pelos métodos não convencionais devido ao tempo que estas técnicas requerem para a extracção dos seus componentes (Delfanian, M. et al, 2015).

Os métodos não convencionais conseguem não só diminuir o tempo do processo, como aumentar o rendimento da extração e permitir um melhor controlo destas condições. De entre estes métodos destacam-se os que usam os ultrassons, as micro-ondas e a extração por fluído supercrítico. Os ultrassons são uma técnica recente, que não necessita de equipamentos complexos e têm um custo relativamente baixo (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010). Os ultrassons funcionam, por banho ou sonda, devido às forças de cisalhamento criadas que causam implosão das bolhas de cavitação fazendo com que o efeito da cavitação acústica cause danos nas paredes celulares, aumentando o rendimento do processo, pois o produto é libertado da célula para o solvente (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010; Delfanian, M. et al, 2015). Esta técnica é muito utilizada para o isolamento de compostos alvo de plantas, no entanto existe a possibilidade de destruição dos compostos antioxidantes (Herrera, M. C. e Castro, M. D. L. de, 2005; Delfanian, M. et al, 2015). O método de micro-ondas é rápido e eficiente, atua através de dois mecanismos: rotação de dipolos ou condução iónica (movimento da carga de iões presente no soluto e solvente) (Routray, W. e Orsat, V., 2014). As micro-ondas irradiadas atuam penetrando nas células, aumentando a pressão interna e causando a disrupção da sua estrutura, levando à libertação dos compostos (Zheng, X. et al, 2012). As principais vantagens das micro-ondas são a alta eficiência, o baixo consumo de solvente, a alta qualidade do produto a baixo preço e o facto de esta ser uma técnica “verde” com baixa ou nenhuma emissão de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) (Zheng, X. et al, 2012). Este método de extração foi já aplicado à extração de vários compostos fenólicos (Routray, W. e Orsat, V., 2014). A extração por fluído supercrítico (fluído com características tanto de líquido como de gás, dependendo das condições de temperatura e pressão) usa frequentemente CO<sub>2</sub>, um solvente não polar e de natureza lipofílica, mas que não consegue extrair compostos de alto peso molecular (Delfanian, M. et al, 2015; Serra, A. T. et al, 2010). Este composto é o mais usado, pois não é inflamável, não é tóxico, é pouco dispendioso, facilmente disponível na sua forma pura e não é explosivo (Poontawee, W. et al, 2015). Todavia, é um solvente fraco para a extração de componentes polares como é o caso dos fenóis, uma vez que estes têm baixa solubilidade em CO<sub>2</sub> supercrítico. Esta desvantagem pode ser ultrapassada recorrendo à utilização de co-solventes, tais como o etanol, acetona e metanol, que aumentam a solubilidade dos compostos e a seletividade da extração (Delfanian, M. et al, 2015; Serra, A. T. et al, 2010). A principal desvantagem do método é o facto da sua aplicação comercial continuar restrita, devido aos custos de investimento e por ser um processo novo e pouco conhecido (Poontawee, W. et al, 2015). Atualmente já foi utilizado o etanol como co-solvente para a extração de compostos fenólicos (Serra, A. T. et al, 2010).

### 2.3.2. Purificação

Os extratos contêm uma grande diversidade de componentes químicos, e dada a sua utilização posterior para aplicação no estudo da sua atividade biológica, têm de passar por uma fase de purificação com o intuito de remover os interferentes, os quais poderiam influenciar os resultados dos testes subsequentes.

Um método normalmente usado para realizar esta purificação é um processo de cromatografia líquida. Para concentrar ou obter frações ricas em fenóis, existem várias estratégias entre elas, a extração sequencial, a extração líquido/líquido e/ou extração em fase sólida (*SPE - solid phase extraction*). No caso de extratos de frutos como a cereja, um dos objetivos é a remoção dos açúcares interferentes, para a qual a metodologia mais utilizada é a SPE, baseando-se no facto de os açúcares serem componentes polares não fenólicos. Este método é bastante rápido, económico e sensível, baseando-se na utilização de uma matriz sólida (adsorvente), e uma fase líquida (eluente) (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010). Os componentes de interesse, os compostos fenólicos, ficam retidos; os compostos interferentes, os açúcares, serão eluídos por uma fase líquida, seguido pela utilização de outro eluente que irá remover os compostos fenólicos que se encontravam retidos na coluna (Zwir-Ferenc, A. e Biziuk, M., 2006).

A seleção da fase sólida deve ser feita cuidadosamente, tendo em conta os mecanismos de interação entre a fase sólida e os componentes de interesse. Assim, tudo depende das propriedades químicas, neste caso, dos compostos fenólicos, nomeadamente o facto de serem polares e serem hidrofóbicos. Os mecanismos mais comuns de retenção são baseados nas forças de Van der Waals (interações não polares), pontes de hidrogénio, forças dipolo-dipolo (interações polares) e interações catiões-aníões (interações iónicas). Estes mecanismos dependem da capacidade de ligação do composto de interesse à matriz, a qual deve ser superior do que a capacidade de ligação do composto à fase móvel inicial (Zwir-Ferenc, A. e Biziuk, M., 2006).

Existem 4 mecanismos de extração após retenção: fase reversa, fase normal, exclusão molecular e troca iónica. No caso de interferentes como os açúcares, o mecanismo de extração é o de troca iónica. Neste mecanismo, o composto pode ser isolado num grupo amina alifático quaternário ligado a uma superfície de sílica. No caso dos compostos fenólicos é utilizada uma troca aniónica, sendo que os compostos fenólicos ficam retidos e os açúcares eluem com a passagem de um eluente como a água. A retenção é assim baseada nas atrações electroestáticas da carga dos grupos funcionais dos fenóis com a carga do grupo que está ligado à sílica que será a matriz (Zwir-Ferenc, A. e Biziuk, M., 2006).

### 2.3.3. Caracterização química

A caracterização química que é efetuada nos extratos envolve normalmente uma quantificação dos compostos bioativos. Esta quantificação é influenciada pela natureza química do analito, pelo método escolhido, pela seleção de padrões e pela possível presença de interferentes (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010). Entre variedades de cereja, a quantidade de compostos bioativos varia consoante a predisposição genética, climática, as condições de cultivo e o nível de maturação (Petkovic, B. et al, 2014).

#### 2.3.3.1. Determinação dos compostos fenólicos totais

Diversos métodos têm sido descritos para a quantificação dos compostos fenólicos, presentes nos extratos vegetais, no entanto, o método colorimétrico que recorre ao reagente de Folin-Ciocalteu é um método simples e reprodutível, sendo o ácido gálico frequentemente utilizado como padrão (Hanbali, L. B. et al, 2013; Dai, J. e Mumper, R. J., 2010).

O método baseia-se numa reação de redução, onde ocorre a transferência de eletrões de uma solução alcalina de fenóis, pelo reagente de Folin-Ciocalteu, um heteropolianião molibdotungstosfosfórico amarelo. Neste reagente de Folin-Ciocalteu, inicialmente os estados de oxidação do molibdénio e tungsténio, são +6. É adicionada uma solução de carbonato de cálcio, para a obtenção de um pH alcalino e ocorre uma reação de redução devido à presença de agentes redutores, que neste caso, serão os compostos fenólicos. Após um tempo de reação, é lida a absorvância do complexo resultante, molibdotungstosfosfato azul, cujo estado de oxidação varia entre 5 e 6 (Cicco, N. et al, 2009). A absorvância depende da qualidade e quantidade de fenóis presentes na solução, mas também do pH das soluções, obtido pela adição da solução de carbonato de cálcio (Cicco, N. et al, 2009). As desvantagens deste método encontram-se relacionadas com a presença de interferentes que podem imiscuir-se de um modo aditivo ou inibitório. O efeito aditivo pode dever-se, por exemplo, à presença de altos níveis de açúcares, fenóis presentes indesejados e devido a amins aromáticas. Quanto ao efeito inibitório deve-se à presença de oxidantes que vão competir com o reagente após a solução estar alcalina, assim o reagente de Folin-Ciocalteu deve ser adicionado antes da solução de carbonato de sódio (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010). Estas desvantagens fazem com que este não seja um método específico, sendo contudo o mais utilizado pela sua reprodutibilidade e facilidade de aplicação.

### **2.3.3.2. Determinação dos açúcares redutores totais**

Os açúcares são componentes que atribuem o sabor adocicado a vários alimentos e bebidas, estando presentes nos frutos de forma natural.

Os açúcares simples são designados por monossacarídeos, ou seja, são hidratos de carbono não polimerizados, na sua forma simples. Destes, os mais comuns são a frutose, glucose e a galactose. Os outros açúcares existentes devem-se ao facto dos açúcares simples se ligarem através de ligações formando dissacarídeos como a sacarose, maltose e lactose, se dois a dez monossacarídeos se ligarem formam oligossacarídeos. Os açúcares redutores são todos os monossacarídeos, mas também os oligossacarídeos, os quais contêm extremidades reductoras. Como o excesso de consumo de açúcares causa efeitos adversos na saúde, a Europa tem uma legislação para controlar os níveis de açúcar, nomeadamente a sacarose, em determinados alimentos (Baskan, K. S. et al, 2016).

No caso particular das cerejas, apesar do seu baixo índice glicémico, pois tem pouca glucose, existem outros açúcares presentes em quantidades consideráveis que podem interferir nas caracterizações, sendo necessário quantificá-los. A forma mais rápida e simples para realizar esta determinação é através de métodos colorimétricos. A maioria destes métodos baseia-se na oxidação dos grupos carbonilo através de uma reacção com absorção na zona do UV-visível. Alguns baseiam-se na redução do Cu(II) ou Fe(III) pelos açúcares redutores e na complexação de iões de metais de transição reduzidos com certos ligandos através de um reagente sem cor dando um produto colorido, contudo estes métodos são demorados e pouco específicos (Baskan, K. S. et al, 2016).

Surge assim o método do ácido dinitrossalicílico (DNS) que é um dos mais utilizados e simples. Este método baseia-se na redução do ácido 3,5-dinitrossalicílico, o reagente de DNS reage com, em condições alcalinas, com o grupos carbonilo dos açúcares redutores formando o 3-amino-5-nitrosalicilato, um composto aromático com um máximo de absorção a 540 nm (Baskan, K. S. et al, 2016).

### **2.3.3.3. Determinação dos flavonóides**

Os flavonóides acumulam-se principalmente nos tecidos externos da fruta, nomeadamente na pele, o que se deve ao facto de a sua síntese ser estimulada pela luz solar (Haminiuk, C. W. I. et al, 2012). Quanto à quantificação dos flavonóides totais, presentes nos extratos, o ensaio colorimétrico é, novamente, o mais utilizado, sendo o mais referido um que se baseia na formação de um complexo de alumínio (Hanbali, L. B. et al, 2013).

Este ensaio colorimétrico pode recorrer a dois procedimentos: i) a solução de cloreto de alumínio, com concentração entre 2-10 %, é adicionada à amostra/extrato na presença de

uma solução de ácido ou acetato e são efetuadas leituras após algum tempo de reação a 404-430 nm; ii) a reação com formação do complexo de alumínio ocorre na presença de nitrito de sódio (NaNO<sub>2</sub>) em meio alcalino, baseando-se na nitração de um anel aromático com um grupo catecol que não tem as suas posições substituídas ou bloqueadas. Em qualquer dos procedimentos, pela formação do complexo de alumínio existe o desenvolvimento de uma cor amarelada (Pekal, A. e Pyrzynska, K., 2014).

O método escolhido para este trabalho foi aquele em que o extrato do fruto é adicionado a uma solução metanólica de cloreto de alumínio e acetato de potássio. Após um curto período de tempo, a absorvância é medida e comparada com um padrão flavonoide, normalmente a quercetina ou a rutina (Haminiuk, C. W. I. et al, 2012). A desvantagem deste método baseia-se numa estimativa do conteúdo total de flavonóides, não nos fornecendo uma quantidade para cada tipo de flavonóide. No entanto, apresenta vantagens como a simplicidade e eficiência, o que evita o uso de equipamentos complexos como o HPLC (*high performance liquid chromatography*) (Haminiuk, C. W. I. et al, 2012).

#### **2.3.3.4. Determinação de antocianinas**

O método mais simples para quantificar antocianinas baseia-se na capacidade destas para absorver luz na região do visível, através da medição da absorção a um comprimento de onda entre 490 e 550 nm, pois esta é uma banda de absorção que se situa longe das bandas de absorção dos outros compostos fenólicos (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010).

Os métodos de pH baseiam-se na colorimetria, pois a tonalidade das antocianinas (vermelho, laranja, roxo) varia consoante este fator, assim para um pH ácido, as antocianinas são vermelhas (Teixeira, L. N. et al, 2008). Conhecem-se dois métodos, o de pH único e o de pH diferencial. Quanto ao método de pH único, este é um método bastante simples, no entanto apenas é recomendado quando se tem a certeza de que na amostra não existem interferentes. E o método de pH diferencial é um método mais sensível que elimina a ação dos interferentes (Teixeira, L. N. et al, 2008). Neste método, inicialmente é medida a absorção da amostra num tampão a pH 1, onde as antocianinas têm uma coloração intensa (antocianinas com cor). Depois eleva-se o pH para 4,5 onde as antocianinas praticamente não têm cor (antocianinas como hemiacetais sem cor). A diferença entre as absorvâncias permite o cálculo da fração real de antocianinas presente na amostra (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010). Para o cálculo da quantidade de antocianinas presentes na amostra é utilizada a cianidina-3-glucosídeo como padrão, sendo que o cálculo final pode utilizar o peso molecular e o coeficiente de extinção molar do padrão ou então utilizar o padrão para efetuar uma reta de calibração (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010).

## **2.3.4. Determinação da atividade biológica**

### **2.3.4.1. Determinação da atividade antioxidante**

O processo de oxidação é bastante importante, pois é através deste processo que são produzidos os radicais livres. Estes, por sua vez, são importantes em vários processos, entre os quais, a degradação de alimentos, por oxidação de lípidos provocando o sabor a ranço nos alimentos; a degradação de químicos e inúmeras doenças em humanos, onde cada tipo de molécula pode ser danificada (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010).

Os antioxidantes são substâncias que independentemente da sua concentração previnem, reduzem ou inibem o processo de oxidação evitando a formação dos radicais livres pela sua captação ou por diminuição do stress oxidativo (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010).

Nos organismos vivos e em condições normais, existe um balanço entre a produção de radicais livres e proteção antioxidante, contudo sobre a influência de certos fatores endógenos e exógenos este balanço pode ser destruído. Portanto o stress oxidativo é um estado onde existe um desequilíbrio, existindo um excesso da quantidade de espécies reativas de oxigénio e/ou azoto (ROS/RNS) que é superior à capacidade antioxidante endógena, o que vai levar à oxidação de várias biomacromoléculas (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010). O stress oxidativo, é bastante importante, pois pode levar à formação de várias doenças degenerativas crónicas, entre elas o cancro (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010).

Quanto às aplicações dos antioxidantes, elas variam bastante desde a prevenção da oxidação de polímeros até à prevenção da descoloração de pigmentos sintéticos ou naturais. Contudo, a área de maior interesse nestes compostos é a área da saúde (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010). No ser humano, o sistema de proteção antioxidante não é adequado para prevenir completamente o excesso de produção de radicais livres, sendo necessário consumir uma quantidade adicional de antioxidantes, papel que pode ser desempenhado pelos compostos fenólicos, com a vantagem de serem compostos naturais (Petkovic, B. et al, 2014).

Os compostos fenólicos são considerados potentes antioxidantes que podem atuar de 3 modos diferentes: i) captando os radicais livres, ROS/RNS; ii) suprimindo a formação dos mesmos radicais pela inibição de certas enzimas ou quelando metais envolvidos na sua produção; iii) ou regulando/ protegendo a defesa antioxidante (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010).

Estes compostos têm uma estrutura ideal de antioxidante devido aos grupos hidroxilo presentes na sua estrutura que doam átomos de hidrogénio e devido ao extenso sistema aromático conjugado que deslocaliza os eletrões desemparelhados. As antocianinas são particularmente reativas com os radicais livres devido à sua estrutura com deficiência em eletrões. A atividade antioxidante dos flavonóides depende de 4 fatores: i) a estrutura orto-dihidroxi no anel central, que tem as melhores propriedades para doar eletrões, confere

estabilidade ao radical e deslocaliza eletrões; ii) a dupla ligação com a função 4-oxo no anel terminal que é responsável pela deslocalização de eletrões do anel central; iii) os grupos hidroxilo 3 e 5 com a função 4-oxo dos anéis inicial e terminal, essenciais para a captação dos radicais e iv) o grupo hidroxilo 3 que é importante na atividade antioxidante. A atividade antioxidante dos ácidos fenólicos depende da quantidade de grupos hidroxilo presentes na molécula (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010).

Assim, estes compostos atuam principalmente como aceitadores de radicais livres e quebradores de cadeias, que conseguem atuar na oxidação de lípidos e outras moléculas pela rápida doação de átomos de hidrogénio aos radicais. Os radicais intermediários conseguem ser estáveis, dada à sua ressonância entre estruturas, e assim uma nova reação em cadeia é facilmente iniciada. A reação termina quando os radicais intermediários reagem com outros radicais intermediários (Szabo, M.R. et al, 2007).

Existem vários métodos para quantificar a atividade dos antioxidantes, de entre os quais se destacam o método FRAP (método do poder antioxidante de redução férrico), o método  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e o método de DPPH (2,2 - difenil-1-picrihidrazil). A diversidade de métodos existente deve-se aos diferentes tipos de atividade antioxidante que podem ser determinados e à complexidade dos substratos, ou seja, à quantidade de grupos funcionais, polaridade e comportamento químico dos diferentes compostos dos extratos (Szabo, M.R. et al, 2007).

O método de DPPH é o método mais frequentemente utilizado para a determinação da atividade antioxidante. Este componente, o DPPH, é um radical livre estável devido à deslocalização dos seus eletrões que faz com que este tenha uma coloração violeta num comprimento de onda perto dos 520 nm. Este método sustenta-se na mistura deste radical livre com um substrato (amostra a analisar) que atua como dador de átomos de hidrogénio, formando assim uma forma não radical estável do DPPH, a qual passa de cor violeta a amarelo pálido (fig.4) (Szabo, M.R. et al, 2007).

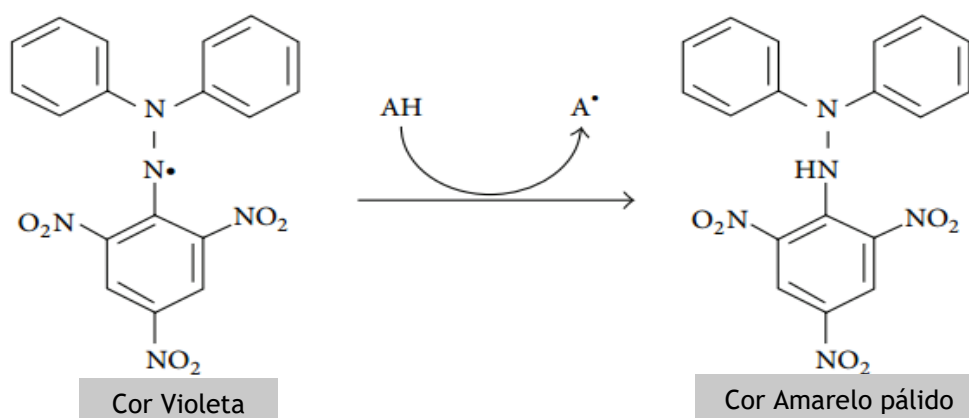
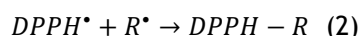


Figura 4 - Esquema do método de DPPH - adaptada de Teixeira, J. et al, 2013

As reações envolvidas neste método são as descritas em (1) e (2), onde DPPH• é o radical estável, AH é o substrato/ antioxidante a analisar e R• são espécies radicalares, que se formam com o decorrer da reação e se transformam em produto (Szabo, M.R. et al, 2007).



## 2.4. Atividade antimicrobiana

Os diversos compostos bioativos, como os flavonóides, fenóis e antocianinas existentes na cereja, têm vindo a ser vastamente estudados pelo seu efeito contra agentes patogénicos, dado que impedem a invasão e crescimento dos mesmos nas plantas e frutos (Serra, A. T. et al, 2010; Nohynck, L.J. et al; 2006). Atualmente, estes compostos naturais têm sido alvo de atenção devido à elevada rejeição pelo consumidor de produtos químicos e sintéticos. Uma outra razão é o facto de as terapêuticas normalmente utilizadas, como os antibióticos, terem vindo a perder a sua eficácia devido ao aumento de resistências por parte dos microrganismos (Arendt, P. et al, 2016). Estas razões associadas aos benefícios para a saúde dos compostos fenólicos, como por exemplo o seu potencial anticancerígeno, anti-inflamatório e outros, salientam o interesse da utilização destes compostos na terapêutica (Demirdöven, A. et al, 2015). Dois exemplos de frutos, que contêm compostos fenólicos e que são bastante estudados e apresentam propriedades antimicrobianas, são o mirtilo e o arando. A utilização do mirtilo foi descrita contra desordens gastrointestinais e o arando tem sido utilizado no tratamento de infeções urinárias, sendo que foi demonstrado que também consegue controlar o crescimento de *Listeria monocytogenes* (Nohynck, L.J. et al; 2006).

Assim sendo, a resistência antimicrobiana e a forma como compostos naturais podem modelá-la são fatores de interesse no estudo destes compostos.

### 2.4.1. Resistência antimicrobiana

A resistência a antimicrobianos está descrita como tendo surgido devido a uma seleção natural por parte dos microrganismos, na qual estes desenvolveram mecanismos por forma a sobreviverem a substâncias tóxicas, estes mecanismos de proteção incluem a regulação da entrada e saída destas substâncias da célula; produção de enzimas que destroem ou modificam os agentes antimicrobianos; ou alteração do alvo terapêutico (Holmes, A. H. et al, 2016).

Quanto aos tipos de resistências existentes, um das mais preocupantes é a resistência a antibióticos, pois tem crescido exponencialmente nas últimas décadas, não só com o número de diferentes microrganismos resistentes, mas também com a sua localização geográfica e a magnitude da resistência. Contudo, não só as bactérias se tornaram resistentes, mas também os fungos, parasitas e os vírus, que conseguiram adaptar-se às mais de 15 classes de antibióticos cujos alvos variam, e aos quais deveria ser difícil de se tornarem resistentes (tabela 2). A resistência a antibióticos depende da junção de dois fatores, do agente antimicrobiano e da resistência genética. O primeiro fator é dependente do agente antimicrobiano, pois este inibe organismos suscetíveis e seleciona microrganismos resistentes. O segundo fator é a resistência genética em microrganismos já selecionados pelo antimicrobiano, assim quando estes dois fatores se unem podem levar a problemas de infecções causados por estes microrganismos (Levy, S. B. e Marshall, B., 2004).

As resistências têm de ser consideradas não só a nível do sistema de saúde, mas também a nível da comunidade. A emergência da resistência antimicrobiana é um fenómeno natural, mas em que o uso indiscriminado de antibióticos em humanos e animais funciona como agente acelerante (Levy, S. B. e Marshall, B., 2004). Antibióticos aplicados a animais levam à seleção de formas resistentes das bactérias que são depois transmitidas entre animais e através destes para os humanos, ou até mesmo para outras bactérias (Mehndiratta, P.L. e Bhalla, P., 2013). Considerando isto, a diminuição do uso de antibióticos quando a sua utilização não é justificável é vista como uma forma de redução do aumento de resistências. A introdução de novas abordagens terapêuticas é também vista como uma medida importante, sendo exemplo desta o desenvolvimento de novos antibióticos com novos alvos terapêuticos, tais como os produtos dos genes alvo da infeção, ou o estudo de novos compostos com potencial antimicrobiano (Levy, S. B. e Marshall, B., 2004).

*Tabela 2 – Famílias de antibióticos e respetivos mecanismos de ação - adaptado de Levy, S. B. e Marshall, B., 2004*

Mecanismo de ação	Famílias de Antibióticos
Inibição da síntese da parede celular	Penicilinas; Cefalosporinas; Carbapenemos; Daptomicina; Monobactamos; Glicopéptidos
Inibição da síntese proteica	Tetraciclina; Aminoglicosídeos; Oxazolidinonas; Estreptograminas; Cetolídeos; Macrólidos; Lincosamidas
Inibição da síntese de DNA	Fluoroquinolonas
Inibição competitiva da síntese de ácido fólico	Sulfonamidas; Trimetoprim
Inibição da síntese de RNA	Rifampina
Outro	Metronidazole

As bactérias multirresistentes têm um impacto significativo a nível clínico, pois o tratamento de infeções causadas por estas é difícil e dispendiosa, conseguindo duplicar o tempo

de estadia do paciente no hospital, duplicar a taxa de mortalidade e aumentar a taxa de morbidade. Exemplos de microrganismos a nível global, cujas estirpes apresentam mais multirresistências são *Mycobacterium tuberculosis*, *Enterococcus faecium*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Acinetobacter baumannii* and *Pseudomonas aeruginosa* (Levy, S. B. e Marshall, B., 2004). De entre estes podem ser salientados por se encontrarem bem caracterizados: *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, as quais são bactérias patogénicas Gram positivas e Gram negativas, respetivamente, cuja importância é reconhecida tanto em infeções adquiridas a nível hospitalar como na comunidade (Mabhiza, D. et al, 2015).

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) para além de ser um microrganismo de nível hospitalar é também bastante encontrado a nível alimentar, sendo que as intoxicações alimentares devem-se à ingestão de alimentos com presença de enterotoxinas termoestáveis produzidas pelo microrganismo. Este microrganismo produz uma grande variedade de exoproteínas, proteínas que são secretadas para meio extracelular, ajudando na patogénica e causando infeções em humanos e animais (Heredia, N. et al, 2009). Esta bactéria consegue crescer entre 7- 47,8 °C, sendo a sua temperatura ótima de crescimento perto dos 35 °C. Quanto ao pH, consegue crescer entre 4,5-9,3 sendo o pH ótimo entre 7-7,5. É uma bactéria bastante tolerante ao sal, resistente a nitratos e capaz de crescer em ambientes com atividade de água a cerca de 0,83. Esta tolerância permite ao microrganismo sobreviver sobre diferentes condições e ser difícil de eliminar (Heredia, N. et al, 2009).

*Pseudomonas aeruginosa* é um agente patogénico oportunista, encontra-se associado à colonização e infeção de órgãos vitais no ser humano, particularmente em pacientes imunocomprometidos. *Pseudomonas aeruginosa* está também associada a muitas infeções hospitalares, pois consegue colonizar equipamentos hospitalares (Ulrey, R. K. et al, 2014). Quanto à sua capacidade de infeção, este é um microrganismo bastante associado a sepsia e inflamações, mas não só, para além destas infeções, está normalmente presente nos biofilmes de queimaduras, feridas crónicas e úlceras de pressão diabética. Os principais fatores de virulência desta bactéria, que podem facilitar o processo de infeção, são a sua capacidade para a formação de biofilmes, mas também a produção de elastase, pioverdina, proteases e piocianina (Ulrey, R. K. et al, 2014).

Não conseguindo evitar a entrada/colonização por parte de um microrganismo resistente, a resistência antimicrobiana pode afetar o hospedeiro de duas formas diferentes. Numa primeira forma, uma bactéria resistente pode transmitir os seus genes de resistência para outra bactéria tornando-a ainda mais patogénica, uma vez que estes genes serão adicionados aos seus próprios fatores de virulência e resistência. A segunda forma é o fato de a terapia necessária, para eliminar o microrganismo, ser tão forte que pode ser tóxica para o hospedeiro, levando a consequências ainda mais graves. Microrganismos resistentes conseguem mesmo ser resistentes a antibióticos de largo espectro como fluoroquinolonas, vancomicina e

carbapenemos (Levy, S. B. e Marshall, B., 2004), pelo que é necessário encontrar novas terapêuticas e até mesmo novos alvos que não apenas a inibição do crescimento microbiano.

#### **2.4.2. Mecanismos de virulência**

A grande maioria dos agentes antimicrobianos atua na inibição do crescimento do microrganismo de forma a combater a infecção, no entanto vários tipos de estratégias antimicrobianas têm sido estudadas no sentido de evitar o desenvolvimento de resistências, por exemplo evitando não só a infecção como a própria colonização do microrganismo no hospedeiro. Assim, os agentes antimicrobianos poderiam atuar ao nível da produção de fatores de virulência, pois estes podem ser produtos, estruturas ou estratégias que permitem ao microrganismo entrar, sobreviver ou colonizar locais onde normalmente não conseguiria, causando mais danos nos hospedeiros ou desregulando o seu sistema imunológico. Assim sendo, os fatores de virulência são um importante alvo terapêutico, para o desenvolvimento de novas estratégias ou compostos que atenuem ou inibam os mesmos (Hill, C., 2012).

Considerando que nas últimas décadas não têm surgido novas moléculas de antibióticos torna necessário investigar novos compostos/moléculas para a terapêutica antimicrobiana (Levy, S. B. e Marshall, B., 2004). Os compostos naturais são atualmente os mais investigados, pois são aceites pela população e os custos da sua investigação são mais baixos (Mabhiza, D. et al, 2015). Para além destes factos, muitos destes compostos são metabolitos secundários, como os compostos fenólicos, e estão envolvidos nos sistemas de proteção de plantas, sendo portanto antimicrobianos naturais. Atualmente, para estes compostos puros não está comprovado que induzam resistência nos microrganismos que infetam a planta, sendo possivelmente uma alternativa viável à terapêutica convencional (Holmes, A. H. et al, 2016). O conceito de compostos fenólicos como antimicrobianos naturais associado às suas características fitoquímicas e benéficas para a saúde (potencial anticancerígeno, anti-inflamatório, antioxidante, entre outros) salienta o potencial destes para o desenvolvimento de novos ingredientes alimentares saudáveis e compostos médicos e farmacêuticos, com base por exemplo nos compostos fenólicos das cerejas (Demirdöven, A. et al, 2015).

Como referido anteriormente, os fatores de virulência podem ser vistos como um possível alvo terapêutico, uma vez que contribuem fortemente para a infecção, facilitando a entrada e sobrevivência do microrganismo (Hill, C., 2012). Os fatores de virulência são estruturas ou estratégias que contribuem para a infecção (Hill, C., 2012), ou seja, ajudam na invasão de tecidos e na evasão aos mecanismos de defesa do hospedeiro (Mabhiza, D. et al, 2015). Entre as estruturas bacterianas que contribuem para a infecção estão as cápsulas, flagelos, pili ou sistemas de secreção; as estratégias envolvem a produção de exotoxinas, aquisição de ferro, evasão imunitária ou translocação ou disrupção das membranas das células

hospedeiras. Como tal os fatores de virulência estão associados por um lado à promoção da colonização e sobrevivência do microrganismo e por outro lado envolvidos na origem de danos no hospedeiro (Hill, C., 2012). Alguns dos mecanismos de virulência mais estudados como alvo terapêutico, incluem as bombas de efluxo, *quorum sensing*, motilidade e biofilmes.

#### **2.4.2.1. Bombas de Efluxo**

As bombas de efluxo são um mecanismo de virulência das bactérias e um dos principais fatores de resistência (Mabhiza, D. et al, 2015). As bombas de efluxo são proteínas complexas que se encontram na membrana externa que atua como uma barreira permeável, e reconhecem e expõem substâncias através de diferentes mecanismos e locais de ação. Estas substâncias expelidas podem ser antibióticos, toxinas, antissépticos e desinfetantes, detergentes, metais pesados, ácidos gordos, solventes ou fatores de virulência (Venter, H. et al, 2015).

Os mecanismos de efluxo são reconhecidos como importantes componentes da resistência a diversos antibióticos, existindo assim inúmeros potenciais benefícios na inibição das bombas de efluxo como forma de melhorar a performance dos antibióticos, no entanto, atualmente não existem inibidores de bombas de efluxo para uso clínico (Lomovskaya, O. e Watkins, W., 2001; Venter, H. et al, 2015). Os inibidores de bombas de efluxo ideais devem ter um efeito sinérgico com antibióticos já em uso, restaurar a eficácia dos antibióticos, reduzir a incidência de patogénicos resistentes, devem reduzir a capacidade de infeção dos patogénicos e devem induzir um impedimento à formação de biofilmes (Venter, H. et al, 2015). Os inibidores permitem que certas substâncias consigam atingir concentrações bacteridas ou bacteriostáticas que de outro modo seriam removidas da célula pelas bombas de efluxo (Mabhiza, D., 2015).

Uma potencial fonte de inibidores são as plantas, pois são uma fonte subutilizada de compostos químicos aos quais nunca foi descrita a presença de resistência. Também os seus extratos já mostraram que conseguem potenciar a acção de antibióticos contra microrganismos resistentes, sendo provável que as plantas produzam compostos com capacidade de diminuir a resistência mediada por efluxo (Venter, H. et al, 2015).

#### **2.4.2.2. Quorum sensing**

O *quorum-sensing* tem sido foco de estudo devido ao seu papel na regulação de diversas funções nas células, incluindo os fatores de virulência. Este é um processo que permite a comunicação de célula para célula através da difusão de moléculas emissoras de um sinal químico, baseando-se na síntese e percepção de sinais químicos específicos que se acumulam durante o crescimento bacteriano (Hossain, M. A. et al, 2015; Zhang, W e Li, C., 2016). Estes sinais químicos/moléculas são denominados autoindutores e têm a capacidade de causar uma

alteração na expressão dos genes, provocando uma mudança nas células, quando é atingida uma certa densidade populacional (Zhang, W e Li, C., 2016; Kalia, M. et al, 2015). Os autoindutores variam consoante o tipo de bactéria, nas bactérias Gram positivas, estas moléculas são péptidos autoinduzidos (AIP) e nas bactérias Gram negativas, são conhecidos como homoserinas N-acil lactonas (AHLs) (Zhang, W e Li, C., 2016; Singh, B. N. et al, 2012) (Chenia, H. Y., 2013). A principal diferença entre estes dois tipos de moléculas é a sua estrutura, sendo os AIP, oligopéptidos e os AHLs, pequenos lípidos. Outra diferença é que os AHLs são produzidos, quando necessário, por membros de sintetases autoindutoras proteínas, enquanto as Gram positivas contêm, naturalmente, os oligopéptidos (AIP) no seu ambiente (Federle, M.J. e Bassler, B. L., 2003).

O sistema de *quorum sensing* pode ser afetado de inúmeras formas, tais como pela inibição da biossíntese dos autoindutores, pela degradação dos autoindutores através de acilases e lactonases bacterianas, ou através de pequenas moléculas que bloqueiam a ativação da proteína recetora do autoindutor (Chenia, H. Y., 2013).

A produção de fatores de virulência e secreção de enzimas é potencialmente controlada por este sistema, tal como a motilidade do tipo *swarming* ou desenvolvimento de biofilmes, o que faz deste mecanismo um alvo para atenuação da patogenicidade bacteriana (Zhang, W e Li, C., 2016; Worthington, R. J. et al, 2012; Singh, B. N. et al, 2012).

Os inibidores ideais foram descritos como quimicamente estáveis, altamente efetivos e de baixo peso molecular. Contudo, atualmente os únicos compostos com origem não bactericida que bloqueiam este mecanismo são os compostos halogenados, furanonas. Estas têm origem numa macroalga australiana, no entanto por serem halogenadas não podem ser utilizadas em seres humanos (Chenia, H. Y., 2013). Não obstante, foram descobertas algumas plantas medicinais, que conseguem interferir na sinalização célula-célula e também contêm compostos que mimetizam os autoindutores, o que provou ser uma alternativa válida às furanonas (Singh, B. N. et al, 2012). Para além destas plantas, foram ainda encontrados compostos em frutos e vegetais, com características fitoquímicas antimicrobianas, que conseguem inibir o *quorum sensing* apesar de não inibirem o crescimento de microrganismos (Chenia, H. Y., 2013).

#### **2.4.2.3. Motilidade**

A motilidade é bastante importante para os microrganismos, pois consiste no movimento dos mesmos, ou seja, bactérias sésseis numa superfície podem em conjunto movimentar-se e colonizar uma superfície maior. Existem diversos tipos de motilidade: “*swimming*” (motilidade de células individuais em meio líquido através de flagelos), “*twitching*” (motilidade numa superfície através de pili de tipo IV), “*gliding*” (motilidade sem ajuda de flagelos ou pili) e “*swarming*”. O “*swarming*” consiste no movimento rápido numa superfície através da movimentação de flagelos. Esta capacidade é importante na colonização

de uma superfície, sendo que depende da densidade celular, da forma da célula e do mecanismo flagelar (Kearns, D. B., 2011; Partridge, J. D. e Harshey, R. M., 2012).

A capacidade difere de bactéria para bactéria, pois cada uma adapta-se de forma diferente à superfície e por consequência à falta de água existente na mesma. Contudo, a maioria utiliza o flagelo para ir ao encontro da superfície ligando-se a esta por meio de adesinas bacterianas (Partridge, J. D. e Harshey, R. M., 2012).

Assim sendo, o “*swarming*” é essencial não só para o movimento bacteriano, mas também para a colonização e distribuição sobre uma superfície. Este pode ser considerado um alvo terapêutico, pois inibindo a colonização conseqüentemente inibir-se-ia a infecção. No entanto, continua a de ser necessário encontrar compostos que consigam evitar a motilidade, sendo esta uma área de bastante interesse (O’May, Che e Tufenkji, N., 2011).

#### **2.3.4.1.4. Biofilmes**

A formação de biofilmes é um importante mecanismo de virulência, porque esta estrutura mantém várias células altamente organizadas com diferentes fenótipos de crescimento e expressão de genes, protegidas por uma matriz exopolimérica, o que contribui para uma elevada patogenicidade e resistência dos microrganismos, sendo bastante difíceis de eliminar através de antissépticos e microbiocidas (Worthington, R. J. et al, 2012). Os biofilmes são comunidades de microrganismos aderidas a uma superfície, que pode ser biótica ou abiótica, em que estas comunidades estão envoltas numa matriz polimérica extracelular a qual é constituída por polissacarídeos, proteínas e DNA extracelular (O’Toole, G. et al, 2000; Bakkiyaraj, D. et al, 2013).

A formação dos biofilmes pode ser considerada um ciclo composto por fases, tais como iniciação/adesão, maturação, manutenção e dispersão (figura 5). A primeira fase inicia-se com a ligação irreversível de células planctónicas a uma superfície (adesão), sendo que esta depende das características da superfície, do substrato e da célula, ocorrendo como resposta a estímulos ambientais como é o caso da disponibilidade de nutrientes (Ulrey, R. K. et al, 2014; Donlan, R. M., 2001; O’Toole, G. et al, 2000).

Após a adesão inicia-se uma série de mudanças para os microrganismos se adaptarem à superfície, mudanças essas que incluem a formação de micro-colónias e a produção de polissacarídeos extracelulares os quais dão estrutura e formam a matriz extracelular que protege o biofilme (Donlan, R. M., 2001; O’Toole, G. et al, 2000). A estrutura do biofilme não consiste apenas numa monocamada, mas em camadas heterogêneas com canais de comunicação entre si, que permitem a passagem de nutrientes e oxigénio, e onde as células que estão no interior do biofilme crescem mais lentamente devido à falta dos mesmos (Donlan, R. M., 2001; Worthington, R. J. et al, 2012). Nesta fase é essencial o mecanismo de *quorum sensing* que

permite a comunicação de célula para célula e conseqüentemente o controle do crescimento e dos nutrientes (O'Toole, G. et al; 2000). Este processo é também importante devido às mudanças que provoca nas células, nomeadamente a nível da resistência que estas adquirem, como por exemplo a resistência a antibióticos e luz ultravioleta (Donlan, R. M., 2001). Seguidamente, o biofilme cresce com a adesão de mais bactérias e com a continuação da produção da matriz, sendo esta uma fase de maturação e manutenção (Ulrey, R. K. et al, 2014). A fase final de dispersão, ocorre quando a matriz é quebrada permitindo que as células do biofilme dispersem, na sua forma planctónica ou em aglomerados, e que formem biofilmes noutra local (Ulrey, R. K. et al, 2014).

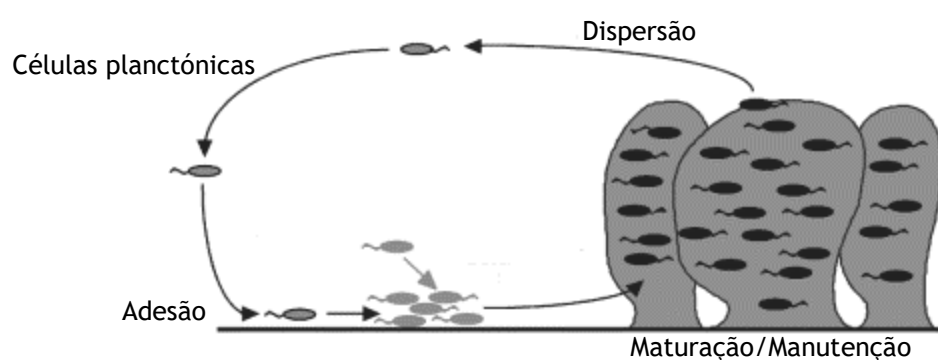


Figura 5 - Ciclo de formação de Biofilmes (adesão, maturação/manutenção, dispersão) - adaptada de O'Toole, G. et al, 2000

Dada a resistência adquirida durante a fase de maturação, os antibióticos apenas conseguem eliminar bactérias que se vão libertando do biofilme, não conseguindo destruir células aderidas (Ulrey, R. K et al; 2014). Esta resistência dos microrganismos faz com que os biofilmes sejam difíceis de eliminar e que estejam associados a doenças infecciosas. Atualmente existe uma correlação entre a formação de biofilmes e doenças infecciosas de cerca de 80% (Worthington, R. J. et al, 2012).

Logo, é bastante importante encontrar novos procedimentos terapêuticos dirigidos à eliminação dos biofilmes. Atualmente existem alguns componentes sintéticos promissores antibiofilme, contudo a procura por compostos naturais é preferível devido à aceitação dos mesmos (Bakkiyaraj, D. et al, 2013).

De entre os extratos naturais com propriedades antibiofilme, os mais estudados são os extratos de plantas ou frutos, com estudos em mirtilos, pertencentes à família *Rosaceae*, que são ricos em polifenóis, demonstrando que estes compostos têm um efeito inibitório na formação de biofilmes de várias estirpes de *S. aureus* em concentrações subinibitórias (Worthington, R. J. et al, 2012).

Outro exemplo é o caso do alho que contém compostos com propriedades de antimicrobianas, tendo sido comprovado que os seus compostos contribuem para a inibição de biofilmes. Um estudo *in vitro* provou que o tratamento de biofilmes com extratos de alho, tornam os biofilmes mais suscetíveis ao tratamento por antibióticos, pois os extratos conseguem modular o *quorum sensing* e assim afetar o biofilme (Worthington, R. J. et al; 2012).

Em suma, todos os métodos e resultados que irão ser abordados nos próximos capítulos, traduzem o estudo realizado para a determinação da atividade antimicrobiana de extratos de seis variedades de cereja do Fundão.

## 3. Materiais e Métodos

### 3.1. Preparação das amostras de cerejas

Neste trabalho foram utilizadas 6 variedades de cereja do Fundão, com diferentes tipos de ocorrência ao longo da época, sendo elas Brooks, Earlise, Primulat, Summit, Sweetheart e Saco (figura 6). Dado que a variedade Saco é característica da região do Fundão, foram utilizados dois tipos desta variedade de cereja, uma tipologia de cereja colhida no início da época de produção e outra tipologia, mais madura, colhida no final da época de produção.

Todas as variedades de cereja foram gentilmente cedidas pela empresa CerFundão e foram conservadas a -20 °C até posterior utilização.

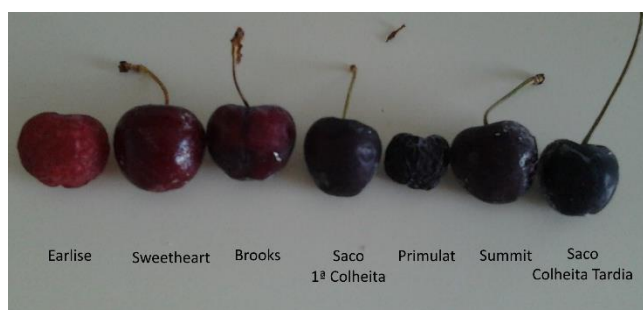


Figura 6 - Variedade de cereja utilizadas ao longo da dissertação

Inicialmente foram removidos os caroços às cerejas e estas foram cortadas em quartos e colocadas em tubos que foram posteriormente guardados numa câmara de congelação a -80 °C, com uma dupla camada de parafilme perfurada, onde permaneceram durante pelo menos 24 h. Estes foram posteriormente colocados em azoto líquido e num liofilizador (ScanVac Cool Safe, Frilabo), durante 3 dias, com o intuito de remover toda a água das cerejas (Bastos, C. et al; 2014).

### 3.2. Extração

A extração dos componentes das diversas variedades de cereja foi realizada num banho termostático (P-Selecta Unitronic-OR) a 35 °C durante 2 h, com agitação de 64 rpm/min, seguido de centrifugação (Beckman Coulter Allegra™ 25R Centrifuge) a 8000 rpm durante 20 minutos. O processo de extração foi realizado 2 vezes para cada amostra, com remoção do solvente (Oancea, S. et al, 2013). O solvente resultante das 2 extrações juntou-se no final.

A proporção massa-solvente utilizada foi de 1 g para 20 mL de solvente, sendo que o solvente utilizado foi metanol a 100 %.

Para a extração foram calculados os rendimentos através da utilização da equação 3.

$$\eta = \frac{\text{massa de extrato obtido}}{\text{massa de cereja liofilizada pesada}} \times 100 \quad (3)$$

Para a caracterização das antocianinas foi realizada um outro tipo de extração em que o solvente utilizado foi metanol a 99,9 % com 0,1 % de HCl. Este solvente foi o selecionado, porque contém um ácido forte, ainda que adicionado em pequenas quantidades, permite estabilizar as antocianinas auxiliando a sua extração sem degradação das mesmas (Hayaloglu, A. A. e Demir, N., 2015).

Em ambos os casos, o solvente foi removido por evaporação (Rotavapor R-215, Buchi Switzerland) a pressão reduzida e a 35-40 °C, até obtenção do extrato seco a 35-40 °C. Na evaporação do solvente metanol 99,9 % com HCl 0,1 %, foi efetuado um controlo mais rigoroso da temperatura, dado que as antocianinas começam a degradar-se a partir dos 35 °C (Oancea, S. et al, 2013).

### 3.3. Purificação cromatográfica dos extratos

Os compostos fenólicos existentes nos extratos de cereja foram purificados através da utilização de uma coluna C-18 Sep-Pak, Waters de troca aniónica (Bastos, C. et al, 2015). Os compostos fenólicos ficam retidos e os compostos interferentes, os açúcares, eluem com a passagem de uma fase móvel.

Para obter um rendimento elevado em compostos fenólicos, foi necessário realizar uma optimização do processo, e para tal, foram testadas 2 quantidades de amostra distintas a aplicar na coluna, 1 g e 500 mg de cada extrato, de forma a avaliar a capacidade de retenção da matriz da coluna. A dissolução das amostras foi também testada com diferentes solventes, nomeadamente metanol a 5 % e água destilada acidificada. No caso da água destilada foi necessário proceder ao ajuste do pH das amostras para 2,5 (Metrohm, modelo 744) recorrendo a uma solução de ácido sulfúrico (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) a 0,5 M. O ajuste de pH é um requerimento da constituição da matriz, pois matrizes baseadas em sílica têm um pH entre 2 e 7,5, sendo importante ter um pH dentro desta gama, caso contrário corre-se o risco de a fase sólida se dissolver (Zwir-Ferenc, A. e Biziuk, M., 2006). Um outro motivo para ajuste de pH tem a ver com a carga das moléculas que se pretende separar, pois os compostos fenólicos a pH ácido

ficam carga global negativa permitindo a sua retenção na matriz. A dissolução dos extratos foi realizada na proporção 1/10, 1 g de extrato para 10 mL de solvente.

A coluna foi acondicionada, primeiro pela passagem de 5 mL de metanol puro e depois com 3 mL de água destilada (figura 7) (Bastos, C. et al, 2015). Antes da adição da amostra, foi realizada uma purga de cerca de 2-3 mL de ar com a ajuda de uma seringa. Purga necessária para a remoção de todas as impurezas e vestígios do acondicionamento.

Após adição da amostra, realizou-se a recolha de frações de 2 mL, estas foram lidas no UV no espectrofotómetro com construção do respetivo cromatograma. De seguida, efetuou-se a eluição dos compostos interferentes, com 3 mL de água destilada, neste caso maioritariamente os açúcares (figura 7) (Bastos, C. et al, 2015). Foi novamente realizada uma purga para evitar que os compostos interferentes pudessem sair nas próximas frações, as quais passaram a ser recolhidas de 1 em 1 mL.

Os compostos fenólicos foram eluídos utilizando 15 mL de metanol (figura 7) (Bastos, C. et al, 2015). A coluna foi posteriormente regenerada usando acetona pura, cerca de 3-4 mL para remoção de todos os pigmentos (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010). A eluição de compostos foi seguida espetofotometricamente a 270 nm.

A elaboração dos cromatogramas, com o intuito de comparação das amostras e eleição das melhores condições de purificação. As leituras das frações recolhidas foram realizadas num espectrofotómetro a 270 nm, comprimento de onda onde o ácido gálico, padrão dos compostos fenólicos, é absorvido (Teledyne ISCO, 2012).

A eficácia da purificação foi avaliada através da quantificação dos açúcares redutores totais, assim como dos fenóis totais nas frações recolhidas após a passagem de metanol e posterior comparação com os resultados da caracterização dos extratos, nomeadamente os dos açúcares redutores totais.

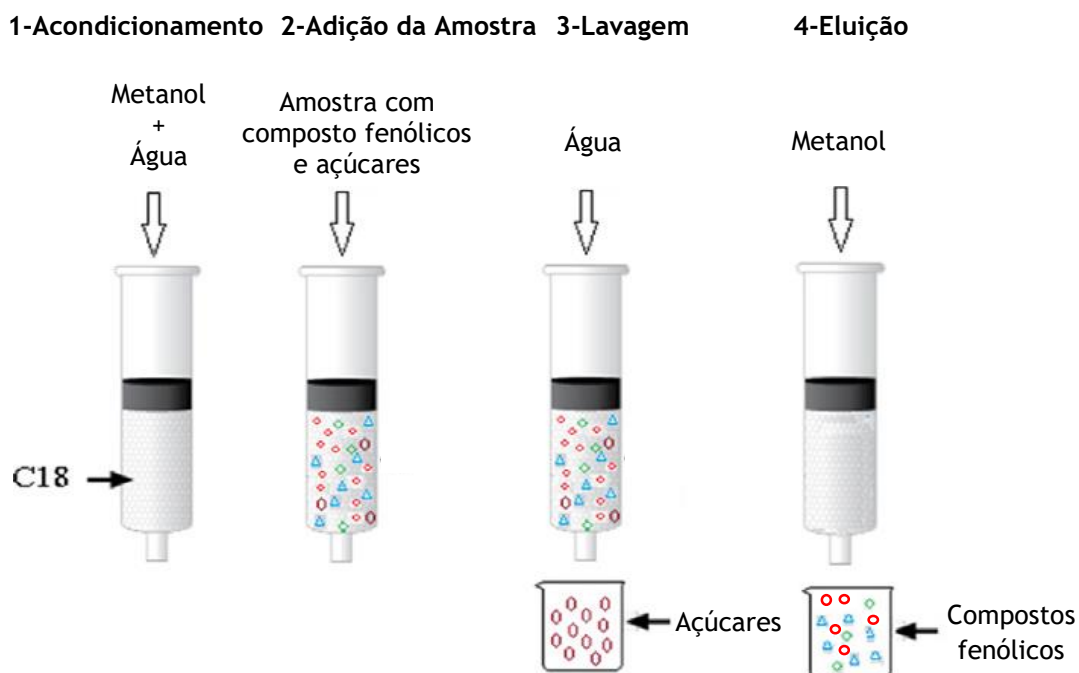


Figura 7- Esquema da purificação adaptada de Baskan, K. S. et al; 2015

### 3.4. Caracterização química dos extratos

#### 3.4.1. Quantificação dos fenóis totais

A determinação dos fenóis totais presentes nos extratos foi efetuada utilizando o método de Folin-Ciocalteu, um método colorimétrico.

Inicialmente, foi elaborada uma reta de calibração (figura 8) usando ácido gálico como padrão de referência, usando soluções em metanol com diferentes concentrações, nomeadamente 50, 100, 150, 200, 275, 350, 400 e 500 mg/L.

Assim, para 50 µL de cada uma das concentrações anteriores foi adicionado 450 µL de água destilada e 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N, em tubos de ensaio. Deixaram-se reagir as soluções durante 5 minutos e de seguida adicionaram-se 2 mL de uma solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 75 g/L). Posteriormente, colocaram-se os tubos de ensaio num banho termostatizado a 30 °C, sobre agitação intermitente, durante 1 h e 30 min. O branco foi realizado de igual forma substituindo os 50 µL de amostra por metanol.

No final da reação, foram efectuadas as leituras das soluções num espectrofotómetro (Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech), num comprimento de onda de 765 nm. Todas as soluções e leituras foram realizadas em triplicados (Luís, Â. et al, 2012).

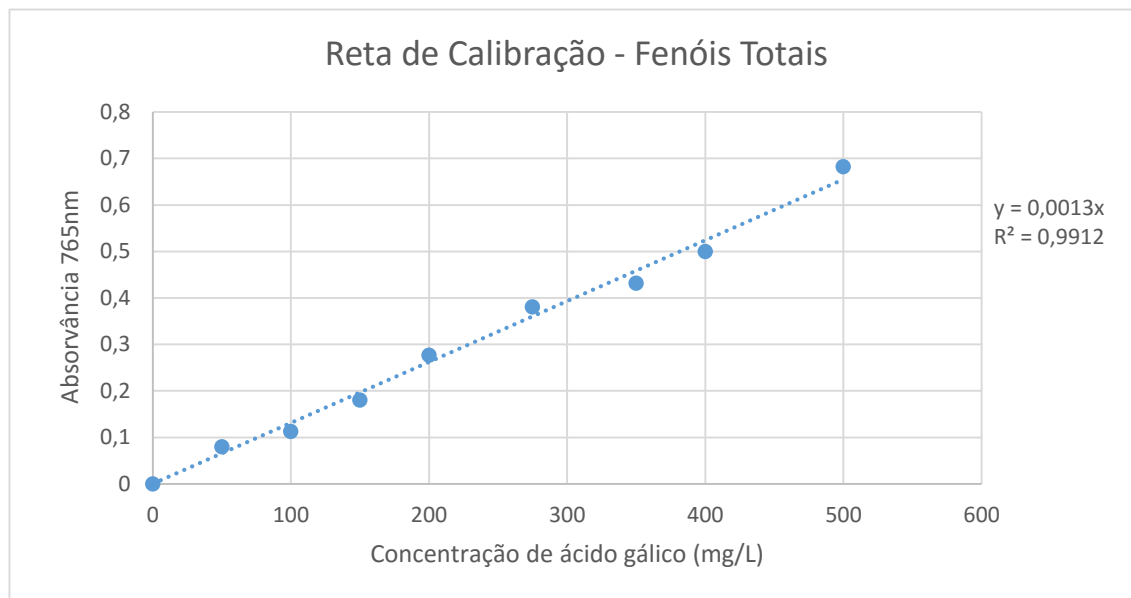


Figura 8 - Reta de calibração para a quantificação de fenóis totais nos extratos

Para a determinação dos fenóis totais nos extratos procedeu-se de igual forma como para a reta de calibração, usando 50  $\mu$ L da solução de cada extrato para cada variedade de cereja antes da evaporação dos mesmos. A concentração inicial das amostras de extrato foram calculadas no final tendo por base, o peso de extrato após a evaporação e o volume de amostra evaporado. Também as soluções e leituras das amostras foram realizadas em triplicado.

A equação da reta de calibração serviu para o cálculo final de quantificação dos fenóis totais sendo os resultados apresentados em unidades de miligramas de equivalentes de ácido gálico por 100 gramas de cereja fresca (mg GAE/100 g cereja fresca).

### 3.4.2. Quantificação dos flavonóides totais

A determinação dos flavonóides totais foi realizada recorrendo a um método colorimétrico. A quantificação destes compostos foi realizada recorrendo à elaboração de uma reta de calibração (figura 9). A quercetina foi utilizada como padrão de referência, sendo as soluções preparadas em metanol com diferentes concentrações, nomeadamente 6, 12,5, 30, 50, 70, 100, 130, 150 e 200 mg/L.

A reta foi realizada adicionando 500  $\mu\text{L}$  de cada uma das soluções anteriores a um tubo de ensaio e acrescentando, de seguida, 1,5 mL de metanol, 0,1 mL de cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ , 10%), 0,1 mL de acetato de potássio ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{K}$ , 1 M) e 2,7 mL de água destilada. Deixou-se reagir durante 30 minutos, à temperatura ambiente, com agitação intermitente. O branco foi preparado de igual forma, mas substituindo os 500  $\mu\text{L}$  de amostra por metanol.

Procedeu-se à leitura das soluções, num espectrofotómetro (Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech), a 415 nm. Todas as soluções foram preparadas em triplicado (Luís, Â. et al, 2012).

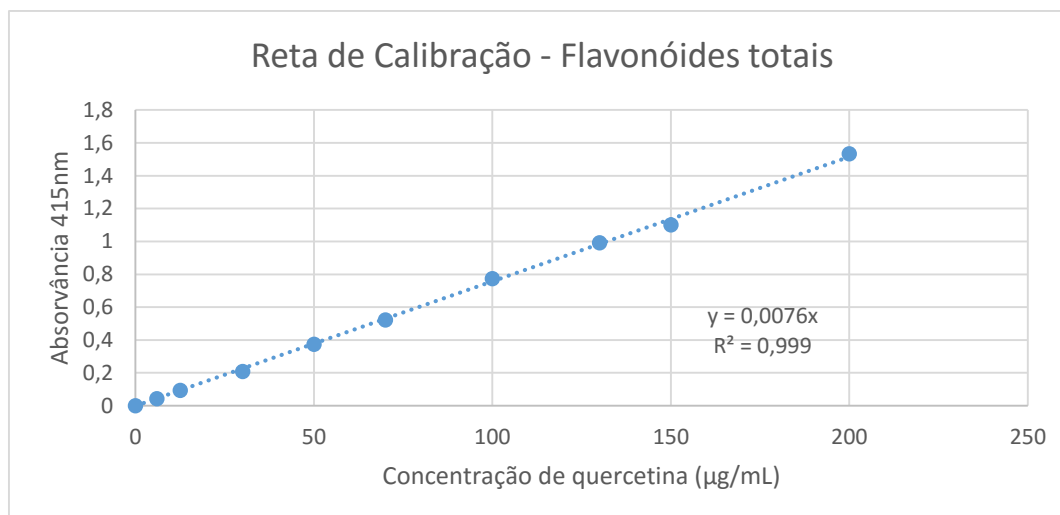


Figura 9 - Reta de calibração para a quantificação dos flavonóides totais nos extratos

Para a determinação dos flavonóides totais nos extratos procedeu-se do mesmo modo como para as soluções da reta de calibração. Neste caso, os 500  $\mu\text{L}$  de solução de extrato foram preparados, para cada variedade de cereja em metanol, com a concentração de 30 mg/mL. As soluções e leituras das amostras foram realizadas em triplicado.

A equação da reta de calibração serviu para o cálculo final de quantificação dos flavonóides totais, sendo os resultados apresentados em unidades de miligramas de equivalentes de quercetina por 100 gramas de cereja fresca (mg QE/100 g cereja fresca).

### 3.4.3. Quantificação das antocianinas

Para determinar a quantidade de antocianinas presentes nos extratos foi utilizado o método de pH diferencial. Para tal, utilizaram-se dois tampões com diferente pH, 1 e 4,5. Para o tampão de pH 1 foi utilizado o cloreto de potássio (KCl) com uma concentração de 0,03 M, e para o de pH 4,5, foi utilizado acetato de sódio tri-hidratado ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ ) com uma

concentração final de 0,4 M. O acerto de pH dos tampões foi realizando recorrendo a uma solução de ácido clorídrico (HCl) a 5 M.

A quantificação ocorreu adicionando 0,5 mL da solução de extrato (15 mg/mL) a 2 mL de cada um dos tampões. Esta proporção de 1:4 garante que os tampões mantêm o pH das soluções. De seguida, as soluções foram homogeneizadas num vórtex e procedeu-se à leitura das absorvâncias das soluções num espectrofotómetro (Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech) a 520 nm e 700 nm para ambos os tampões. A leitura das amostras a 700 nm permite eliminar a interferência de quaisquer componentes. Neste caso, o branco utilizado foi água destilada.

Para o cálculo final da quantificação das antocianinas totais recorreu-se às equações 4 e 5.

$$A = (A_{520\text{ nm}} - A_{700\text{ nm}})_{\text{pH}1} - (A_{520\text{ nm}} - A_{700\text{ nm}})_{\text{pH}4.5} \quad (4)$$

$$\text{Antocianinas Totais} = \frac{A * M * FD * 10^3}{\epsilon \epsilon * l} \quad (5)$$

Na equação 5, o parâmetro “A” refere-se ao resultado final obtido da equação 4 que envolve as absorvâncias obtidas. O parâmetro “M” é o peso molecular da cianidina-3-glucosídeo, o composto padrão das antocianinas e o mais abundante nas cerejas, “FD” refere-se ao fator de diluição, que neste caso é 4 devido à proporção 1:4,  $10^3$  é o fator de conversão de g para mg,  $\epsilon \epsilon$  é o coeficiente de extinção molar da cianidina-3-glucosídeo e “l” refere-se à largura da célula, neste caso é 1 cm. Os resultados são apresentados em mg equivalente de cianidina-3-glucosídeo/ 100 g cereja fresca (mg Cy-3-glc E/100 g cereja fresca) (Lee, J., 2005).

#### 3.4.4. Quantificação dos açúcares redutores totais

A quantificação dos açúcares redutores foi realizada recorrendo ao método de DNS (ácido dinitrosalicílico). Para tal foi necessária a elaboração de uma reta de calibração (figura 10) por utilização de soluções de glucose dissolvidas em água destilada com diferentes concentrações, nomeadamente 50, 100, 200, 400, 600, 800 e 1000 mg/L. A glucose, sendo um açúcar redutor, foi utilizada como padrão de referência (Baskan, K. S. et al; 2015).

Na realização da reta de calibração adicionou-se, em tubos de ensaio, 0,5 mL das soluções de glucose com diferentes concentrações e para o branco 0,5 mL de água destilada, com 0,5 mL de reagente DNS. Os tubos de ensaio foram rolhados e colocados em água a ferver, onde ficaram durante 5 minutos para permitir a reacção. Em seguida, procedeu-se a um choque-térmico em água fria. Adicionou-se 5 mL de água destilada e homogeneizou-se a mistura

reacional. As leituras foram realizadas num espectrofotómetro a 540nm (Ultrospec 3000 Pharmacia Biotech) (Baskan, K. S. et al; 2015). Todas as determinações foram realizadas em triplicados.

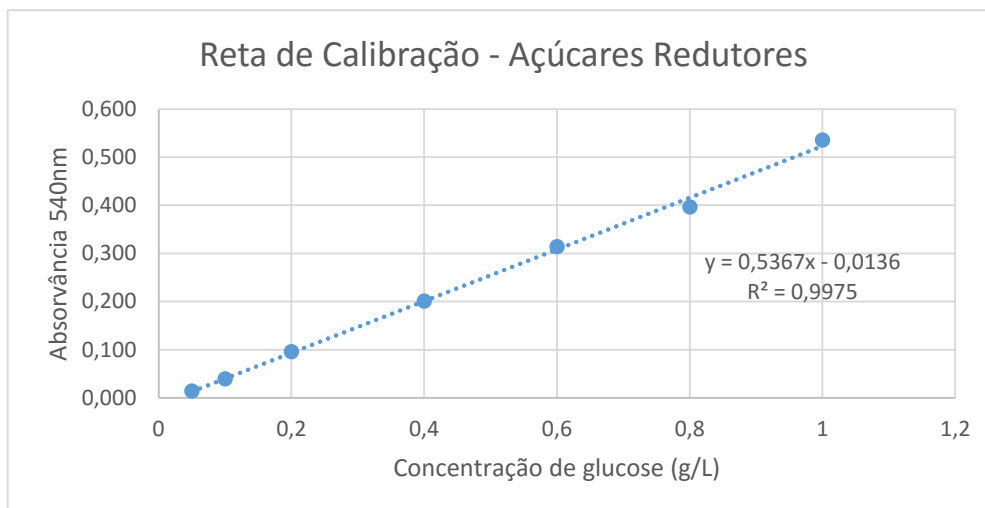


Figura 10 - Reta de calibração para a quantificação de açúcares redutores nos extratos

Para a determinação dos açúcares redutores nos extratos procedeu-se de igual forma como para as soluções da reta de calibração, substituindo os 0,5 mL iniciais por soluções de cada extrato para cada variedade de cereja, previamente preparadas em água destilada, com a concentração de 1 mg/mL.

A equação da reta de calibração serviu para o cálculo final de quantificação dos açúcares redutores totais, sendo os resultados apresentados em unidades de grama de equivalentes de glucose por quilograma de cereja fresca (g /Kg cereja fresca).

### 3.5. Determinação da atividade biológica

#### 3.5.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada através do método de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil). Para tal foi necessária a obtenção de uma reta de calibração (figura 11), sendo preparadas diferentes soluções de DPPH com diferentes concentrações, nomeadamente 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 e 100 µg/mL. De seguida, estas soluções foram lidas, num espectrofotómetro, em duplicado, a 515 nm. O metanol foi usado como branco.

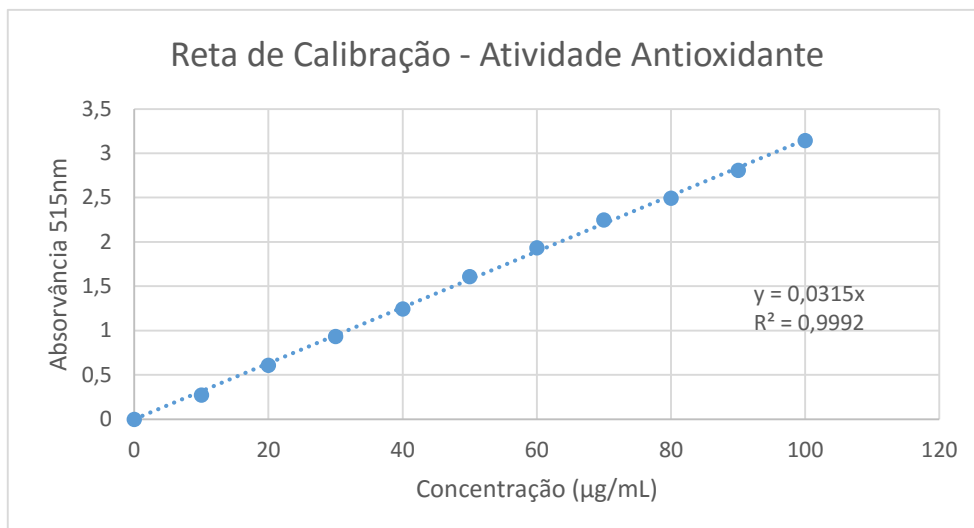


Figura 11 - Reta de Calibração para a determinação da atividade antioxidante nos extratos

Para a determinação da atividade antioxidante nos extratos foram utilizados diferentes tipos de extratos com o intuito de otimizar processo. Para tal foram preparadas soluções com diferentes concentrações, para a determinação da atividade antioxidante de cada variedade de cereja, a partir de extratos da extração com metanol 100%, da extração com metanol 99,9% com 0,1% de HCL e finalmente com extratos obtidos após a etapa de purificação.

As diferentes concentrações de extrato usadas foram 25, 50, 100, 200, 250 e 500 µg/mL. Depois, foram colocados 300 µL de cada solução em tubos de ensaio e foram adicionados 2,7 mL de uma solução de DPPH com concentração de 40 µg/mL. O branco foi realizado para cada concentração, ou seja, era constituído por 300 µL de cada concentração com 2,7 mL de metanol. De seguida fizeram-se leituras de 1 em 1 minuto durante 1 h, num espectrofotómetro a 515 nm (Thermo Spectronic, Helios B). Para comparação, procedeu-se de igual modo para dois padrões antioxidantes, nomeadamente o trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico) com as mesmas concentrações das amostras e a quercetina com concentrações de 25, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL (Luís, Â. et al, 2012).

### 3.5.2. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana do extrato de cereja foi avaliada apenas para o extrato de cereja Saco Colheita Tardia. Este extrato foi selecionado após quantificação dos compostos de interesse e avaliação da atividade antioxidante de todos os extratos em estudo.

Assim, para solubilizar o extrato após o processo de purificação, realizou-se a dissolução do mesmo em dimetilsulfóxido (DMSO) de modo a obter uma concentração final de 250 mg/mL.

### 3.5.2.1. Determinação da concentração mínima inibitória - Leveduras

A suscetibilidade de *Candida albicans* ATCC 90028 à anfotericina B e ao extrato purificado de cereja foi analisada através do método de microdiluição em meio líquido para leveduras, tal como recomendado pelo *Clinical Laboratory Standards Institute* (CLSI) para a determinação da concentração mínima inibitória (CMI) na norma M27-A3 (CLSI, 2008).

Segundo a metodologia descrita o ensaio foi realizado em placas de 96 poços em meio de cultura RPMI1640. Assim, foram realizadas diluições sucessivas de 1:2 do extrato purificado de cereja num intervalo de 10 - 0,078 mg/mL com um volume final de 100 µL. Considerando a utilização de DMSO para aumentar a solubilidade do extrato, a concentração final máxima deste solvente foi de 2% (v/v).

Para a preparação do inóculo de levedura a adicionar, foi realizada uma suspensão direta numa solução salina de 0,85%, partindo de um cultura de 24 horas repicada em meio Sabouraud Dextrose Agar (SDA) e incubada a 30 °C durante 24 h. Esta suspensão foi ajustada para ter uma turbidez de cerca de 0,5 McFarland, o que corresponde a aproximadamente 10<sup>6</sup> Unidades formadoras de colónias/mL (UFC/mL).

Em seguida, procedeu-se à diluição da suspensão anterior de 1:1000 em meio RPMI 1640 e adicionou-se 100 µL a cada poço, obtendo-se poços com uma concentração celular final de 2 x10<sup>2</sup> UFC/mL.

Como controlos negativos foram usados controlos de esterilidade do meio e do extrato aos quais não foi adicionado inóculo e como controlo de crescimento positivo foram usados poços sem extrato. A determinação da CMI foi ainda efetuada para a anfotericina B, de acordo com o descrito, usando concentrações num intervalo de 16 - 0,03 µg/mL.

As placas foram posteriormente incubadas a 37 °C durante 48 h. Os ensaios foram efetuados em duplicado realizando-se pelo menos três ensaios independentes. A CMI foi definida como a concentração mínima de extrato necessária para impedir o crescimento visível do microrganismo.

### 3.5.2.2. Determinação da Concentração mínima inibitória - Bactérias

As bactérias utilizadas nesta metodologia foram *Listeria monocytogenes* LMG 16775, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina MRSA de origem clínica, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

O procedimento para realizado para avaliar a CMI dos extratos para as bactérias referidas segue o descrito na norma M7-A9 do *CLSI*, sendo idêntico ao descrito no ponto anterior com algumas alterações (*CLSI*, 2012). O meio utilizado para repicagem em meio sólido das bactérias foi Mueller-Hinton Agar (MHA) e o meio utilizado para o ensaio de microdiluição foi Mueller-Hinton Broth (MHB), à exceção da bactéria *Listeria monocytogenes*, para a qual os meios Tryptone Soya Agar (TSA) e Tryptone Soya Broth (TSB) foram usados para o favorecimento do crescimento deste microrganismo.

Para a preparação do inóculo de bactérias a adicionar, foi realizada uma suspensão direta numa solução salina de 0,85 %, partindo de um cultura em meio sólido de 24 h repicada e incubada a 37 °C. Esta suspensão foi ajustada para ter uma turbidez de cerca de 0,5 McFarland, o que corresponde a aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL.

Em seguida, procedeu-se à diluição da suspensão anterior de 1:100 em meio e adicionou-se 50 µL a cada poço.

Como controlos negativos foram usados controlos de esterilidade do meio e do extrato aos quais não foi adicionado inóculo e como controlo de crescimento positivo foram usados poços sem extrato. A determinação da CMI foi ainda efetuada para a tetraciclina, de acordo com o descrito, usando concentrações num intervalo de 32 - 0,03 µg/mL.

As placas foram posteriormente incubadas a 37 °C durante 24 h. Os ensaios foram efetuados em duplicado realizando-se pelo menos três ensaios independentes.

### **3.5.2.3. Ensaio de avaliação da potenciação da atividade de um antibiótico**

A potenciação da atividade da tetraciclina pelo extrato purificado de cereja foi avaliada pela metodologia de *checkerboard*, sendo realizado para duas bactérias: *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Assim, o ensaio foi realizado em placas de 96 poços em meio MHB procedendo-se a diluições sucessivas de 1:2 do extrato purificado de cereja com um volume final de 50 µL. Numa outra placa de 96 poços foram realizadas diluições sucessivas de 1:2 do antibiótico tetraciclina com início a uma concentração final no ensaio de 4 µg/mL para *S. aureus* e 64 µg/mL para *P. aeruginosa*. As diluições do antibiótico foram adicionadas às diluições do extrato.

Para a preparação do inóculo a adicionar, foi realizada uma suspensão direta numa solução salina de 0,85%, partindo de um cultura de 24 horas repicada em MHA e incubada a 37 °C. Esta suspensão foi ajustada para ter uma turbidez de cerca de 0,5 McFarland, o que corresponde a aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL. Em seguida, procedeu-se à diluição da suspensão anterior de 1:67 em meio MHB e adicionou-se 50 µL a cada poço. Com a adição do antibiótico

e do inóculo ao extrato, o volume final de cada poço foi de 150 µL. Como controlo foram ainda incluídos um poço de controlo positivo e um de controlo negativo.

A CMI do antibiotico foi confirmado por visualização do crescimento, enquanto o efeito combinatório foi registado no primeiro poço onde antibiótico e extrato se cruzavam sem que existisse crescimento (Wang, S. et al, 2013).

#### **3.5.2.4. Avaliação do papel de bombas de efluxo na resistência ao extrato de cereja**

O papel das bombas de efluxo na resistência ao extrato purificado de cereja foi testado através da determinação da concentração mínima inibitória de extrato em conjunto com um inibidor de bombas de efluxo, verapamil. Assim, a CMI de extrato, de verapamil e CMI de extrato na presença de 400 µg/mL de verapamil foram determinados de acordo com o descrito no ponto 3.5.2.2. Para a determinação da CMI de verapamil usou-se um intervalo de concentrações de 800- 6,25 µg/mL.

No caso da determinação do CMI do extrato em presença de verapamil, procedeu-se a diluições sucessivas de extrato num volume de 25 µL num intervalo de concentração final de 10-0,078 mg/mL e a cada poço adicionou-se 25 µL de verapamil a 1,6 mg/mL. Por fim, foi adicionado 50 µL de inóculo preparado como descrito no ponto 3.5.2.2. As placas foram posteriormente incubadas a 37 °C durante 24 h. O ensaio foi feito em duplicado realizando-se pelo menos três ensaios independentes (Noumedem, J. AK et al, 2013).

#### **3.5.2.5. Avaliação da inibição do processo de *Quorum-sensing* (QS)**

##### **3.5.2.5.1. Avaliação qualitativa**

A avaliação da inibição do processo de “*quorum sensing*” foi realizada usando primeiramente uma metodologia qualitativa de difusão em agar com discos, de acordo com o previamente descrito, usando a estirpe biossensor *Chromobacterium violaceum* ATCC 12472, produtora de um pigmento púrpura, a violaceína (Chenia, H. Y., 2013).

A estirpe *C. violaceum* ATCC 12472 foi inoculada em meio de cultura Luria-Bertani (LB) agar durante cerca de 24 horas a 30 °C, e usada para preparar uma cultura de *C. violaceum* em meio LB incubada por 15 horas a 30 °C a 250 rpm. A esta cultura foi medida a densidade ótica a 600 nm ( $DO_{600nm}$ ) e a mesma foi ajustada com meio LB a uma  $DO_{600nm}$  de 1. De seguida inoculou-se com uma zaragatoa uma placa por três vezes procedendo a rotações da placa de cerca de 45°, de modo a garantir que toda a placa ficou inoculada.

Relativamente aos discos, foram preparados com 5, 15, 20 e 40µL de extrato a 250 mg/mL dissolvido em DMSO, correspondendo a 1,25 mg/disco, 3,75 mg/disco, 5 mg/disco e 10 mg/disco. Após a secagem da placa e dos discos, os mesmos foram colocados na superfície da placa inoculada com a ajuda de uma pinça esterilizada. Como controlo foram utilizados discos com a mesma quantidade de DMSO, e o resveratrol a 64 µg/disco foi usado como inibidor de *quorum sensing* conhecido. As placas foram incubadas numa estufa, a 30 °C, durante 24 horas para posterior visualização dos resultados.

#### 3.5.2.5.2. Avaliação quantitativa

A avaliação quantitativa da atividade inibitória do QS pelo extrato purificado de cereja foi efetuada tomando em consideração a inibição da produção da violaceína por *C. violaceum* ATCC 12472.

A preparação da cultura de *C. violaceum* foi realizada de acordo com o descrito na subseção 3.5.2.5.1. em meio LB. O ensaio foi realizado em tubos de vidro com um volume final de 2 mL, sendo preparadas soluções de extrato a concentrações finais de 0,625, 0,313, 0,156 e 0,078 mg/mL com meio LB e adicionando a suspensão celular a uma  $DO_{620nm}$  final de 0,1. Como controlos foi usado DMSO na mesma concentração existente nos ensaios com extrato e um tubo em que não foi adicionado extrato ou solvente. De seguida, os tubos foram incubados durante 24 h, a 30 °C, 150 rpm.

Após a incubação, foi homogeneizado o conteúdo dos tubos e recolhido 1 mL de cultura, que foram centrifugados a 11000 rpm durante 10 min. Ao depósito celular, foi adicionado 1 mL de DMSO para remoção do pigmento, após uma centrifugação de 11000 rpm durante 10 min, foi recolhido o sobrenadante. A absorvância foi lida em placas de 96 poços num volume de 100 µL a 595 nm. Foram realizados três ensaios independentes.

Para o cálculo final da percentagem de inibição da formação de pigmento foram utilizadas as absorvâncias obtidas e aplicadas na equação 6 por forma a obter a percentagem de inibição da produção de violaceína (Luís, Â. et al, 2016). A análise estatística dos resultados foi efetuada por aplicação do teste *t-student*.

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{Controlo} - \text{Ensaio})}{\text{Controlo}} \times 100 \quad (6)$$

### 3.5.2.6. Avaliação da produção de piocianina e de pioverdina

Após o crescimento da estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853 em meio MHA durante 24 h a 37 °C, suspendeu-se uma colónia isolada em 15 mL de meio LB e incubou-se durante 15 h, a 37 °C e 250 rpm. Apartir desta cultura foi medida a densidade ótica a 600 nm, sendo a suspensão celular ajustada para uma  $DO_{600nm}$  de 0,4.

Para os ensaios de avaliação da inibição de produção de piocianina e pioverdina prepararam-se em tubos de vidro soluções de extrato de cereja purificado em meio LB, para obter concentrações finais de 0,625, 0,313, 0,156 e 0,078 mg/mL, num volume final de 1,5 mL. Os tubos foram inoculados com 15 µL da suspensão celular anterior. Dado que nestas concentrações o extrato diluído em meio apresentou coloração, embora ligeira, foi necessário realizar controlos preparados da mesma forma que o ensaio mas sem adição de microrganismos. Também neste ensaio, a influência do DMSO foi avaliada pela introdução dos respetivos controlos de solvente (DMSO em meio LB nas mesmas concentrações que os ensaios) e foi introduzido um controlo positivo com meio e inóculo. De seguida, os tubos de vidro foram incubados durante 48 h, a 37 °C, 250 rpm.

Após a incubação, procedeu-se à centrifugação a 10000 rpm durante 10 min após a qual foi recolhido o sobrenadante e medida a absorvância a 691 nm (piocianina) e a 400 nm (pioverdina) (Musthafa, K.S. e Voravuthikunchai, S.P., 2015). A análise estatística dos resultados foi efetuada por aplicação do teste *t-student*.

### 3.5.2.7. Avaliação da influência na motilidade de tipo “swarming”

O crescimento da estirpe *P. aeruginosa* ATCC 27853 e preparação da cultura usada para inoculação dos ensaios foi realizada de acordo com o descrito para o ensaio de avaliação da produção de pioverdina e piocianina.

Para a realização desta metodologia, o extrato foi dissolvido em meio LB para eliminar possíveis interferências do solvente, DMSO. Assim, para os ensaios de *swarming* prepararam-se, em tubos de vidro, soluções de extrato de cereja purificado em meio LB, para obter concentrações finais de 0,625, 0,313, 0,156 e 0,078 mg/mL, num volume final 2 mL. Os tubos foram inoculados com 20 µL da suspensão celular ajustada a uma  $DO_{600nm}$  de 0,4. Como controlo foi utilizado um tubo com meio e células. De seguida, os tubos foram incubados a 37 °C, 250 rpm durante 24 horas.

Para avaliar o efeito do extrato na motilidade do tipo “swarming” de *P. aeruginosa* usaram-se placas de meio LB com 0,5% (p/v) de agar, as quais foram secas durante 1 h numa câmara de fluxo laminar. As culturas anteriores foram ajustadas a uma  $DO_{600nm}$  de 0,6 nm e foi colocada uma gota de 5  $\mu$ L no centro de cada. De seguida foram incubadas numa estufa durante 48 h, a 37 °C (Ulrey, R.K. et al; 2014). As placas foram fotografadas e o diâmetro de motilidade foi medido em duas direções.

### 3.5.2.8. Formação de biofilmes

A inibição da formação de biofilmes pelo extrato purificado de cereja foi avaliada sobre dois microrganismos modelo: *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

O crescimento das estirpes *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* ATCC 25923 ocorreu em meio MHA durante 24 h a 37 °C, suspendeu-se uma colónia isolada em 15 mL de meio LB e 10 mL de meio TSB, respetivamente, e incubou-se durante 15 h, a 37 °C e 250 rpm. Apartir desta cultura foi medida a densidade ótica a 600 nm, a qual se ajustou a 0,01.

O ensaio foi realizado em placas de 96 poços em meio LB e TSB, no caso de *P. aeruginosa* e *S. aureus*, respetivamente. Assim, foram realizadas diluições sucessivas de 1:2 do extrato purificado de cereja começando numa concentração final de 0,625 mg/mL com um volume final de 100  $\mu$ L. De seguida foi adicionado 100  $\mu$ L de inóculo aos poços, com a densidade já ajustada.

Como controlo foram realizados controlos do solvente DMSO, com as mesmas concentrações usadas para cada ensaio do extrato e foi efetuado um controlo negativo apenas com meio de cultura e o controlo positivo com meio e células. As placas foram posteriormente incubadas a 37 °C durante 24 h.

Decorrido este tempo, procedeu-se à revelação dos biofilmes. Para tal, foi descartado o conteúdo dos poços e foi efetuada uma lavagem cuidadosa com água destilada por 3 vezes, esta lavagem serviu para remoção de células planctónicas e biofilme fracamente aderido aos poços. Posteriormente, adicionou-se metanol 100 % durante 15 minutos para fixação dos biofilmes. Após o passo de fixação, corou-se o biofilme com o corante violeta de cristal 0,1 % (p/v), durante 15 minutos, ocorrendo depois uma nova lavagem dos poços com água destilada para remoção do excesso de corante. De seguida, foi colocado ácido acético a 33 % (v/v) durante 15 minutos, para dissolução do corante. Posteriormente, transferiu-se 100  $\mu$ L de cada poço para uma nova placa, e a absorvância foi lida a 570 nm.

Para o cálculo da percentagem de inibição da formação de biofilmes foram utilizadas as absorvâncias obtidas e aplicadas na equação 7, por forma a obter a percentagem de inibição

da formação do biofilme (Bakkiyaraj, D. et al, 2013; Ulrey, R.K. et al; 2014). A análise estatística dos resultados foi efetuada por aplicação do teste *t-student*.

$$\% \text{ inibição} = \frac{(\text{Controlo de solvente } 570\text{nm} - \text{Ensaio } 570 \text{ nm})}{\text{Controlo de solvente } 570\text{nm}} \times 100 \quad (7)$$

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1. Caracterização Química

Nesta secção são apresentados os resultados obtidos para a caracterização química, para os extratos das diferentes variedades de cereja que foram obtidos através da extração com metanol a 100%. Como pode ser observado na tabela 3, verifica-se que a extração possibilita a obtenção de rendimentos elevados. Em termos de variedades de cereja, a variedade com menor rendimento é a Earlise, já os extratos com maior rendimento são as variedades de cereja Summit e Brooks.

Tabela 3 - Rendimento das extrações realizadas  $\pm$  desvio padrão

	Extração 100% Metanol
	Rendimentos (%)
Brooks	94,21 $\pm$ 0,58
Primulat	92,68 $\pm$ 0,31
Summit	94,59 $\pm$ 1,16
Saco 1ª Colheita	91,61 $\pm$ 2,33
Saco Colheita Tardia	86,76 $\pm$ 6,57
Sweetheart	89,28 $\pm$ 0,89
Earlise	85,53 $\pm$ 3,00

#### 4.1.1. Fenóis Totais

As cerejas contém compostos antioxidantes bastante importantes em termos de redução do risco de cancro, mas também de outras doenças, como artrite e inflamação. Esta atividade antioxidante das cerejas deve-se provavelmente à quantidade de fenóis que contém, mas também a outros compostos, como por exemplo a melatonina. A quantidade destes compostos pode variar devido a vários fatores entre eles a luz e temperatura. Assim, é bastante importante a sua quantificação (Habib, M. et al, 2015).

A figura 12 regista os resultados obtidos relativamente à quantidade de fenóis nesta parte da caracterização química. Através da observação dos mesmos é possível verificar que o extrato da variedade Earlise tem uma menor concentração deste tipo de compostos. A variedade Saco Colheita tardia apresenta a maior concentração de fenóis mesmo quando

comparada com a mesma variedade, mas de 1ª Colheita. Estes últimos resultados poderão dever-se ao processo de maturação da cereja, o qual poderá influenciar a quantidade de fenóis totais presente, sendo que quanto mais madura a cereja, maior quantidade poderá ter. Os resultados são similares ao referido por Habib, M. et al. (2015) que refere que o nível de maturação das cerejas influencia a sua composição química.

Estudos realizados por Hayaloglu, A. A. e colaboradores (2015) em diversas variedades de cereja, incluindo Summit e Sweetheart demonstram que os resultados obtidos nesta tese são superiores aos resultados de compostos fenólicos obtidos por estes autores, cujos valores variaram num intervalo de 58,31-115,41 mg GAE/100 g cereja fresca. O facto de os resultados serem diferentes, tendo em consideração que duas das variedades testadas foram iguais, pode dever-se ao grau de maturação com que estas variedades foram colhidas, mas também às condições que estiveram sujeitas, nomeadamente condições atmosféricas.

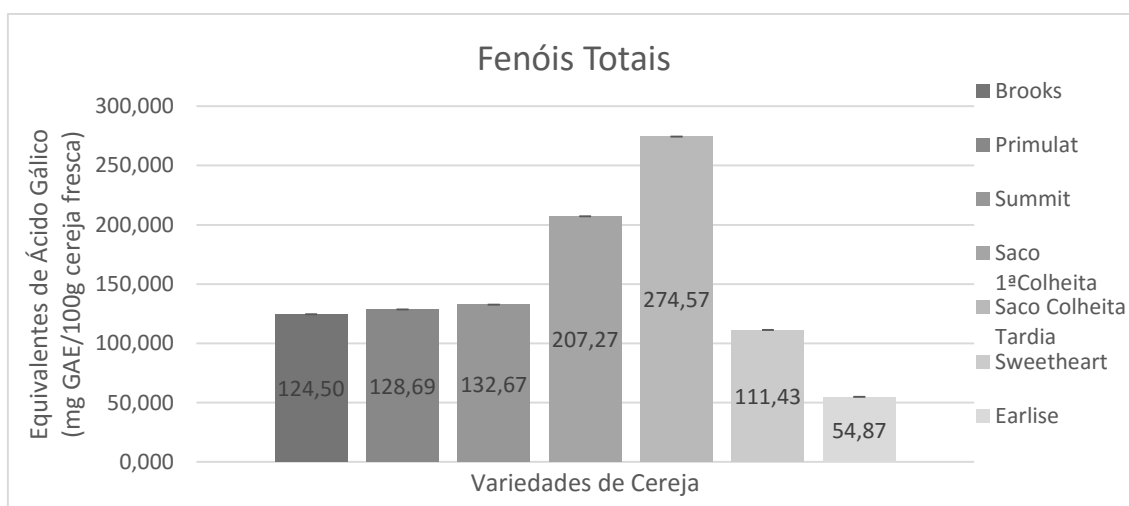


Figura 12 - Fenóis Totais presentes nos extratos de diversas variedades de cereja

#### 4.1.2. Flavonóides Totais

Os flavonóides são um dos grupos de compostos bioativos presentes nas cerejas mais diversificados, sendo os polifenóis mais presentes na nossa dieta (Dai, J. e Mumper, R. J., 2010).

Conforme é possível observar na figura 13, os resultados relativos à quantificação de flavonóides totais nas diversas variedades de cereja variam entre 6,00 e 20,76 mg QE/100g cereja fresca. Destes valores, o extrato que tem maior quantidade de flavonóides é o correspondente à variedade Saco Colheita Tardia e o menor é o extrato da Sweetheart. Quando comparando as variedades de cereja Saco, é possível dizer que com a maturação do fruto existe uma maior acumulação de flavonóides. No entanto, é de destacar que a variedade Primulat

apesar de apresentar um teor em compostos fenólicos relativamente baixo, é a variedade que apresenta o segundo maior teor em flavonóides. Por outro lado, a variedade de cereja Saco 1<sup>a</sup> Colheita, apesar do elevado teor em fenóis, a sua baixa maturação reflete-se num mais baixo teor em flavonóides.

Os valores de flavonóides totais em cerejas brasileiras reportados por Souza, V. R. de et al. (2014), para cerejas de espécie e variedade não identificadas, rondam os 59,92 mg QE/100 g cereja fresca, valores mais elevados que os encontrados neste trabalho, o que pode estar relacionado com diferentes abordagens experimentais ou com a espécie e/ou variedade de cereja utilizada.

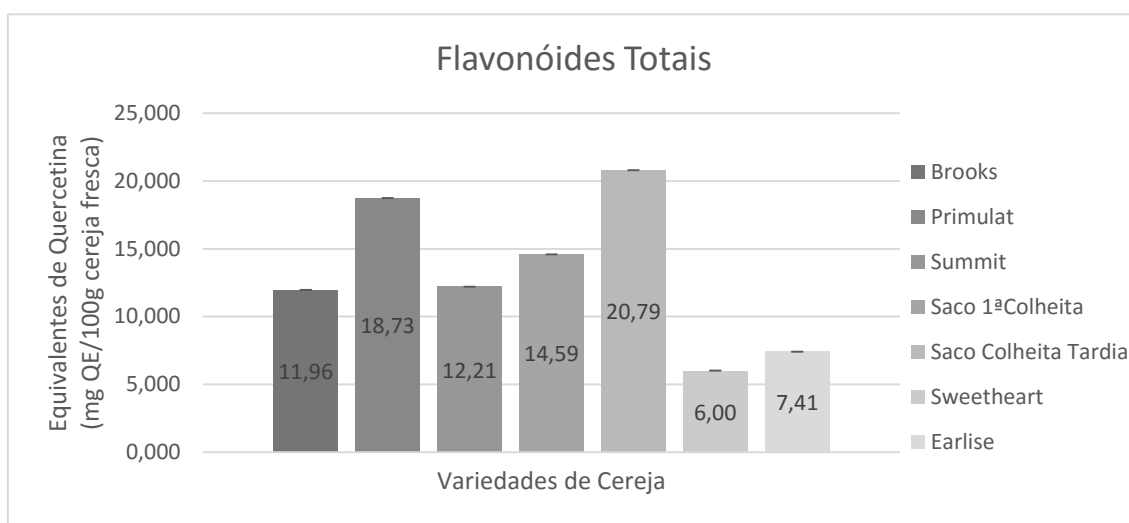


Figura 13 - Flavonóides Totais presentes nos extratos de diversas variedades de cereja

#### 4.1.3. Antocianinas Totais

As antocianinas são os componentes responsáveis pela coloração das cerejas. Assim, quanto maior a quantidade destes compostos, mais escura será a cor da cereja. Para a determinação das antocianinas totais foram utilizados extratos obtidos com o solvente acidificado, nomeadamente metanol 99,9% com 0,1 % de HCl.

Segundo o que é possível observar na figura 14, a variedade com menor quantidade de antocianinas é a variedade Earlise. Já a variedade Saco Colheita Tardia é a variedade que apresenta maior teor de antocianinas. Esta variação no teor de antocianinas totais está de acordo com o que pode ser visualizado na figura 6 onde se observam as várias cores das diversas variedades de cerejas utilizadas ao longo desta tese.

Comparando as variedades de cereja Saco colhidas em duas fases de maturação distintas, mais uma vez se pode referir que com a maturação do fruto, existe um aumento da concentração das antocianinas totais, o que é consistente com o referido anteriormente, para o caso dos flavonóides.

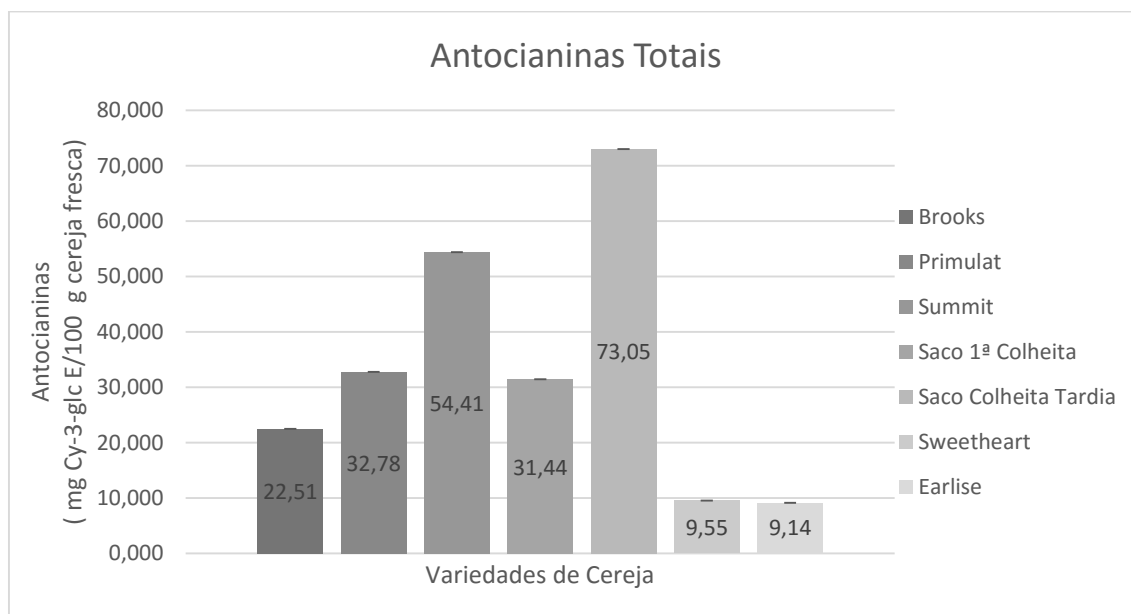


Figura 14 - Antocianinas Totais presentes nos extratos das diversas variedades de cereja

Segundo Habib, M. et al. (2015) a quantidade de antocianinas nas cerejas deve variar entre algumas mg/100 g cereja fresca em cerejas claras até 700 mg/100 g cereja fresca em cerejas mais escuras. Assim, os resultados obtidos apesar de estarem dentro do intervalo obtido pelos autores, não atingem os valores mais elevados. Já segundo o obtido no estudo efetuado por Souza, V. R. de et al. (2014), as antocianinas variaram até 26,72 mg Cy-3-glc/100 g cereja fresca.

#### 4.1.4. Açúcares Redutores

Os açúcares são um dos maiores constituintes da cereja, sendo que os que estão em maior quantidade são a glucose, a frutose, o sorbitol e por fim a sacarose. (Hayaloglu, A. A. e Demir, N., 2015). A glucose e a frutose são dois dos principais açúcares redutores, a sacarose e o sorbitol por não serem açúcares redutores não foram quantificados por este método (Kelebek, H. e Selli, S., 2011).

Como é possível observar pela figura 15, os açúcares estão presentes em maior quantidade no extrato da variedade Sweetheart, sendo na variedade Earlise onde estão em

menor quantidade. Entre as variedades Saco de 1ª Colheita e Colheita Tardia existe uma pequena diferença embora esta não seja considerável. Contudo permite referir que com a maturação do fruto existiu um aumento da quantidade de açúcares presentes.

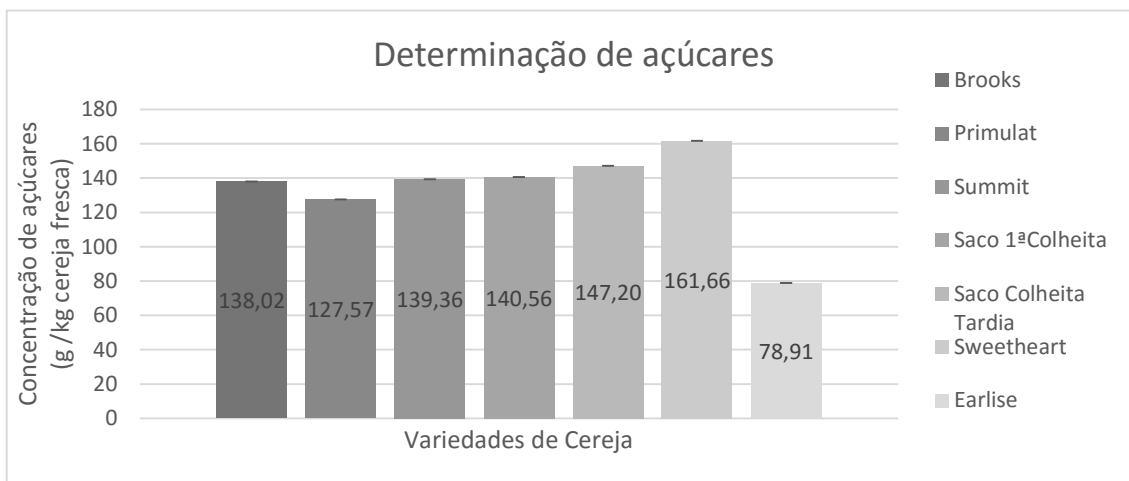


Figura 15 - Açúcares redutores presentes nos extratos das diversas variedades de cereja testadas

Segundo Habib, M. et al. (2015), os valores de açúcares presentes na cereja, determinado por HPLC, varia entre 125-265 g/kg cereja fresca. Os valores obtidos encontram-se dentro deste intervalo, apesar do método ser diferente e muito dificilmente comparáveis, exceto a variedade Earlise cujo resultado se encontra fora do intervalo. Os resultados apresentados por Hayaloglu, A. A. e Demir, N. (2015), também obtidos por determinação por HPLC, têm um intervalo inferior ao referido pelos autores anteriores, com resultados entre 105,55-152,39 g/kg cereja fresca.

## 4.2. Atividade Biológica

### 4.2.1. Atividade antioxidante

Para a determinação da atividade antioxidante foi necessário eliminar a maior quantidade possível de interferentes, nomeadamente açúcares, os quais interferem na avaliação da atividade antimicrobiana, mas também na avaliação da atividade antioxidante, razão pela qual foi realizada uma etapa de purificação da amostra.

Para otimizar esta fase de purificação foram necessárias realizar algumas etapas. Assim, foi necessário testar qual a quantidade de extrato a adicionar à coluna e qual o solvente

a utilizar na dissolução do extrato, de modo a conseguir obter uma maior recuperação de compostos fenólicos. Como tal foram testadas diferentes quantidades de extrato de cereja a aplicar na coluna (1 g e 500 mg de extrato), bem como diferentes soluções para dissolver a amostra antes da purificação, nomeadamente água acidificada com pH=2,5 e metanol a 5%, tal como está descrito na literatura (Chirinos, R et al, 2007).

O extrato usado para a otimização foi o de cereja Saco Colheita Tardia, cujos cromatogramas se podem observar nas figuras 16 a 19. As leituras espectralométricas foram efetuadas sem diluição das soluções, para uma melhor visualização do pico inicial e em qual cromatograma existiria, inicialmente, maior perda de amostra.

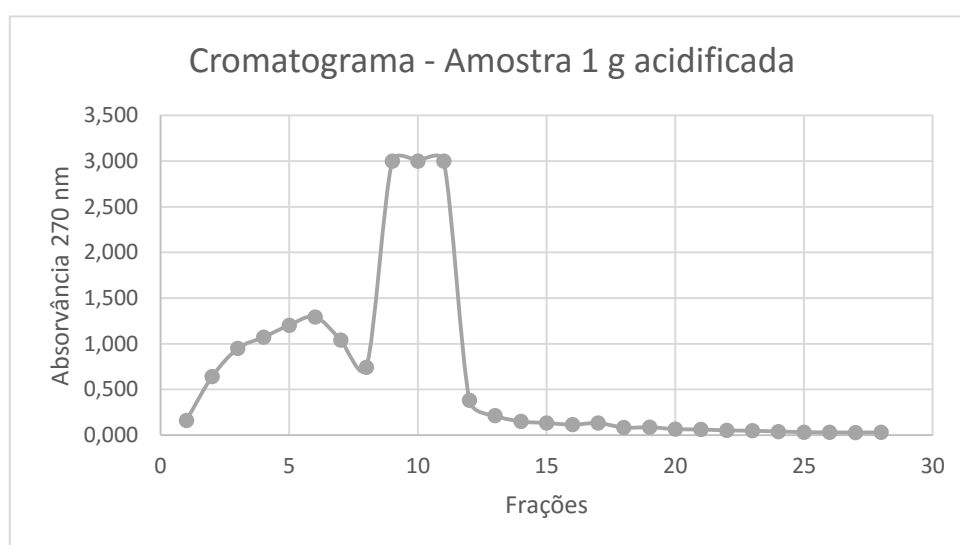


Figura 16 - Cromatograma da purificação do extrato de cereja Saco Colheita Tardia - 1 g em água acidificada pH= 2,5

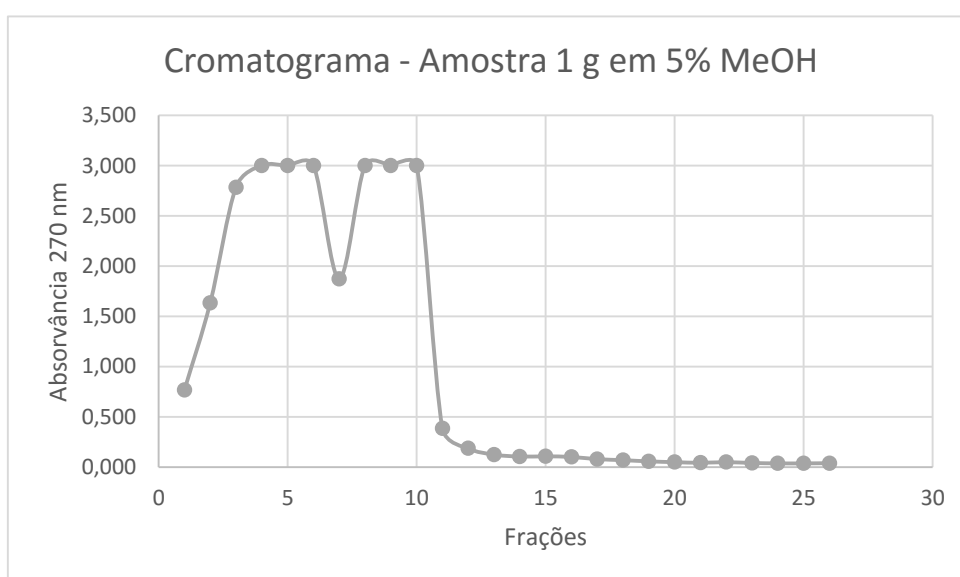


Figura 17 - Cromatograma da purificação do extrato de cereja Saco Colheita Tardia - 1 g em 5% metanol

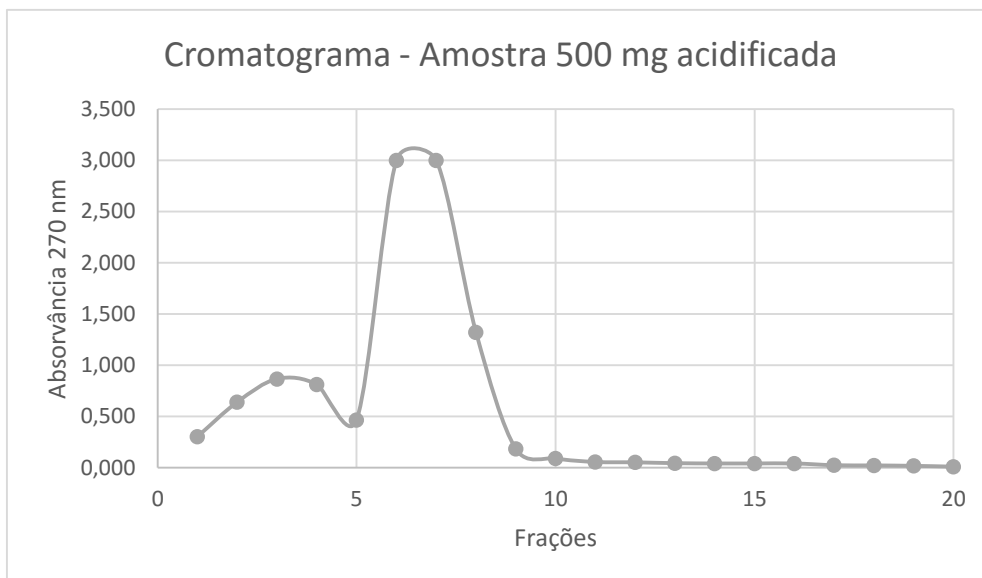


Figura 18 - Cromatograma da purificação do extrato de cereja Saco Colheita Tardia - 500 mg em água acidificada pH=2,5

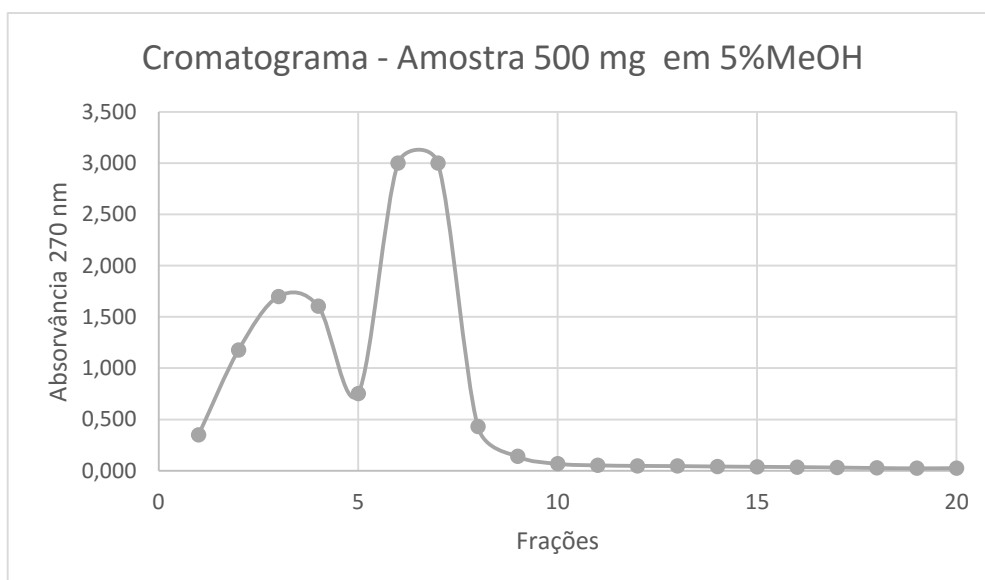


Figura 19 - Cromatograma da purificação do extrato de cereja Saco Colheita Tardia - 500 mg em 5% metanol

Observando os vários cromatogramas é possível verificar que quando a quantidade de amostra adicionada à coluna é maior, existe uma menor perda inicial de compostos, tal pode dever-se a uma sobressaturação da matriz e não conseguindo a mesma reter os compostos fenólicos. Quanto aos diferentes solventes, observando as figuras 18 e 19 nota-se claramente uma diminuição do pico inicial quando o solvente é água acidificada com pH=2,5. O solvente água destilada acidificada com pH=2,5 foi escolhido com o intuito de manter um pH entre 2 e 7,5 devido às características da matriz, mas também para fornecer carga negativa aos compostos fenólicos, uma vez que o processo de separação é baseado numa cromatografia de troca aniônica. Apesar do caráter ácido da amostra dissolvida em metanol a 5 %, a utilização

da água acidificada como solvente do extrato a aplicar na coluna demonstrou permitir uma maior recuperação de compostos fenólicos associado provavelmente ao aumento das cargas negativas dos mesmos a este pH, o que favorece a sua ligação à matriz e assim uma diminuição da perda inicial de compostos fenólicos. Assim, as condições utilizadas para a purificação dos restantes extratos de cereja foram 500 mg de amostra adicionada à coluna dissolvidas em água acidificada de pH=2,5.

A título de exemplo, apresenta-se o cromatograma da purificação do extrato de Saco Colheita Tardia (figura 20) com as leituras das frações, sendo que os restantes cromatogramas são apresentados na secção de anexos.

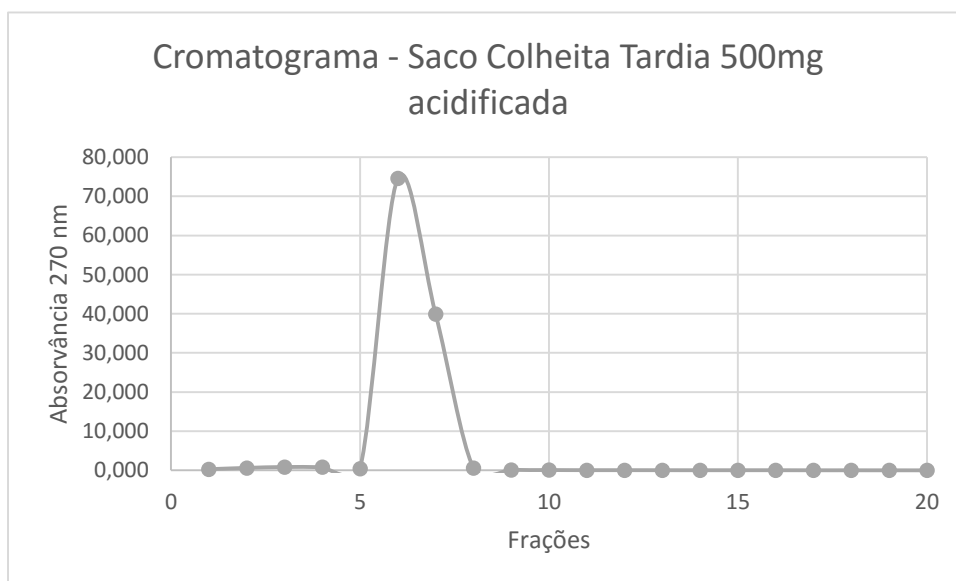


Figura 20 - Cromatograma da purificação do extrato de cereja Saco Colheita Tardia - 500 mg de amostra em água acidificada pH=2,5

Para avaliar a eficácia das purificações foram quantificados os açúcares redutores e fenóis totais nas amostras de extrato de cereja antes e depois do processo de purificação. Os fenóis totais foram também quantificados nas frações recolhidas após a etapa de eluição final com metanol a 100 %, ou seja, nas frações que correspondem ao pico onde ocorre a eluição de fenóis (tabela 4). Os açúcares redutores foram também determinados nas frações após eluição dos açúcares com água destilada, ou seja, foram quantificados nas frações que correspondem ao primeiro pico, onde ocorre eluição dos açúcares redutores (tabela 5).

*Tabela 4 - Comparação dos fenóis totais presentes nas cerejas antes da purificação e nas frações recolhidas relativas ao pico correspondente à eluição dos fenóis após a purificação*

Fenóis totais (mg GAE/mL)		
Variedade	Antes da purificação	Após a purificação
Brooks	170,00	95,77
Primulat	194,62	93,08
Summit	190,00	113,846
Saco 1ª Colheita	269,23	207,69
Saco Colheita Tardia	276,15	214,17
Sweetheart	120,00	110,00
Earlise	132,31	94,62

Por observação da tabela 4 pode verificar-se que existe uma diferença entre os resultados de fenóis obtidos antes e após a purificação. Esta diferença pode dever-se à quantidade inicial de interferentes, açúcares, que os extratos de cereja continham, os quais iriam influenciar o método de determinação dos fenóis totais, sendo os fenóis totais quantificados em excesso por ação dos interferentes. A diversidade de resultados pode ainda estar associada à capacidade de retenção da matriz, uma vez que pode existir perda de fenóis aquando da etapa de purificação, no entanto os resultados demonstram que os extratos purificados obtidos são ricos em compostos fenólicos.

*Tabela 5 - Comparação dos açúcares redutores totais presentes nas cerejas antes da purificação e nas frações recolhidas correspondentes à eluição dos açúcares redutores após a purificação*

Açúcares Redutores totais (g/kg de cereja fresca)		
Variedade	Antes da purificação	Após a purificação
Brooks	138,02	101,40
Primulat	127,57	85,53
Summit	139,36	94,03
Saco 1ª Colheita	140,56	95,58
Saco Colheita Tardia	157,87	94,69
Sweetheart	161,66	99,14
Earlise	78,91	50,32

Tabela 6 - Média dos rendimentos/eficácia da etapa de purificação para os vários tipos de extratos  $\pm$ desvio padrão

	Média dos Rendimentos (%) $\pm$ desvio padrão $(\% \text{ açúcares removidos} = \frac{\text{Açúcares redutores totais após purificação}}{\text{Açúcares redutores totais antes da purificação}} \times 100$
Brooks	71,06 $\pm$ 3,41
Primulat	63,03 $\pm$ 2,84
Summit	65,21 $\pm$ 3,19
Saco 1ª Colheita	67,50 $\pm$ 0,71
Saco Colheita Tardia	59,98 $\pm$ 1,63
Sweetheart	61,30 $\pm$ 0,05
Earlise	61,59 $\pm$ 1,55

Relativamente aos açúcares redutores totais, na tabela 5, observa-se a diminuição de açúcares presentes nos extratos, tendo os extratos purificados uma quantidade menor de açúcares, o que era o objetivo desta etapa. No que diz respeito às quantidades relativas aos açúcares redutores nas diferentes variedades de cereja, existem ligeiras alterações quando comparadas com as quantidades obtidas inicialmente, uma vez que a variedade de cereja que tinha uma maior quantidade de açúcares redutores era a variedade Sweetheart e após a purificação passou a ser a variedade Brooks. Esta alteração poderá dever-se com as diferentes ligações dos açúcares aos compostos fenólicos, nomeadamente às antocianinas, os quais, na variedade Sweetheart, poderão ficar mais retidos do que na variedade Saco Colheita Tardia. Estas ligações poderão ainda influenciar a eficácia da purificação, assim como a quantidade de reutilizações das colunas, pois quanto mais vezes a amostra passa por uma coluna mais irá influenciar a quantidade de açúcares removidos após a purificação. Quanto aos valores dos rendimentos de purificação, tabela 6, estes estão acima de 50%, sendo que a variedade Brooks foi a que obteve o maior rendimento de purificação. A variedade Saco Colheita Tardia foi a que teve menor rendimento, podendo estar associado ao facto de esta ter sido uma das últimas cerejas a serem purificadas e como tal a coluna poderia não estar nas melhores condições.

No entanto, é possível verificar que a introdução deste passo de purificação permite remover interferentes para as determinações seguintes e enriquecer os extratos em compostos fenólicos.

Para a determinação da atividade antioxidante dos diferentes extratos de cereja foi calculada, para cada concentração e para cada minuto em que as absorvâncias foram lidas, a concentração de DPPH no momento, a partir da recta de calibração. Depois foi calculado o DPPH remanescente (%), para tal foi utilizada a equação 8, onde T corresponde ao tempo em

minutos. Sendo que quando  $t=0$  min a concentração de DPPH é igual a  $40 \mu\text{g/mL}$  e quando  $T=t$  depende de  $t$  sendo  $t=1, 2, 3$  até  $60\text{min}$ .

$$\%DPPH_{rem} = \frac{[DPPH]_{T=t}}{[DPPH]_{T=0}} \quad (8)$$

De seguida procedeu-se à representação gráfica para cada variedade de cereja do DPPH remanescente em função do tempo. Para a determinação da atividade antioxidante em EC50 (concentração eficiente necessária para diminuir em 50 % a concentração inicial de DPPH), obtiveram-se os valores finais de  $DPPH_{rem}$  para  $t=60$  min e representaram-se em função da concentração de extrato. Do gráfico obteve-se uma equação da qual se determinou uma concentração que corresponde a  $DPPH_{rem}=50\%$ . Esta concentração será o EC50 e terá de unidades  $\text{mg/L}$ .

A título de exemplo, a figura 21 representa o  $DPPH_{rem}$  em função do tempo para a variedade Saco Colheita Tardia, do extrato bruto de 100 % metanol, para as diferentes concentrações.

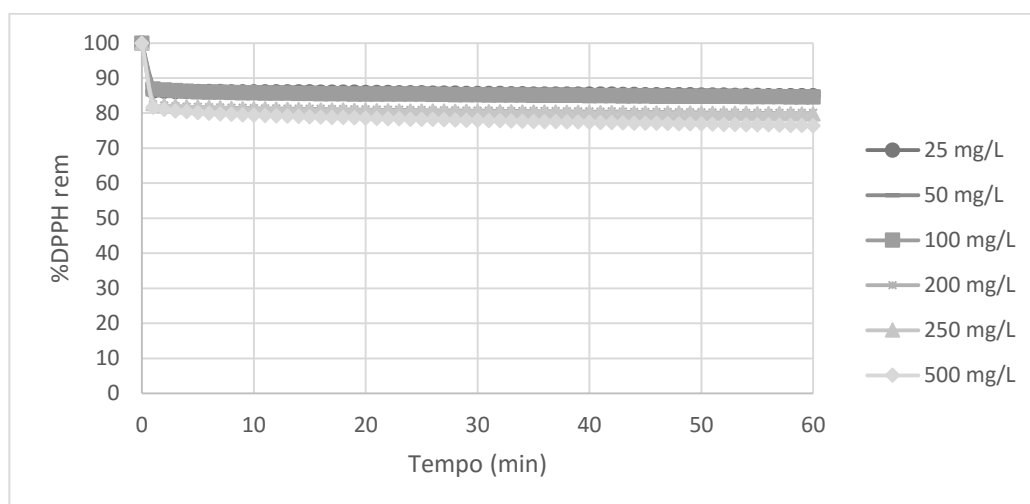


Figura 21 - Comportamento cinético do DPPH em função do tempo para o extrato bruto da variedade de cereja Saco Colheita Tardia

Como é possível observar, pela figura 21 e 22, nenhuma das concentrações consegue atingir a percentagem de diminuição de 50 %, sendo que todas as concentrações têm um comportamento cinético semelhante, não se notando diferenças significativas. Assim e após o cálculo do EC50, a partir da equação, conclui-se que seria necessária uma concentração de  $704,52 \text{mg/L}$  para diminuir em 50 % a concentração de DPPH inicial. Contudo, tal concentração para além de não era consistente com o descrito na literatura, pois a cereja é considerado um fruto com um elevado poder antioxidante, este valor encontra-se fora das concentrações de extrato testadas. Foi ainda observado que para as outras variedades também não era possível o cálculo do EC50, o que fez abandonar o uso destes extratos para este estudo.

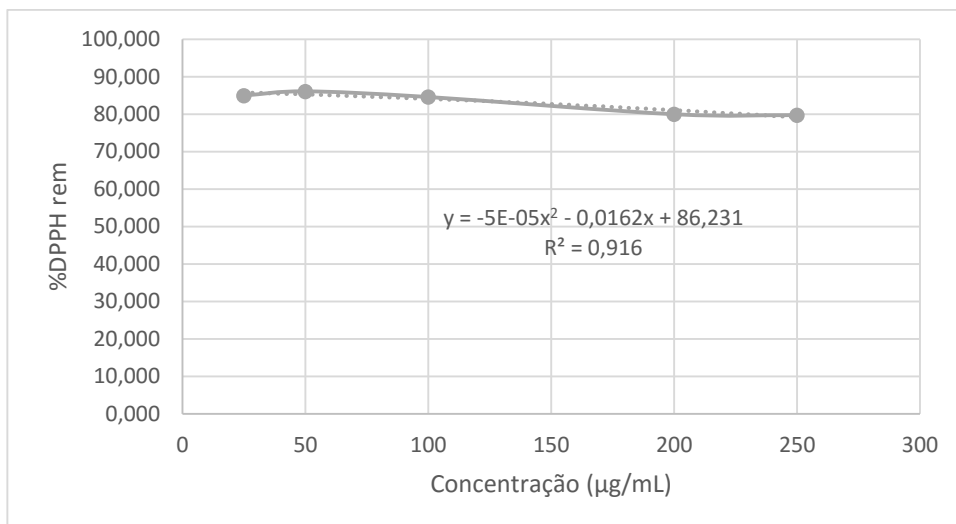


Figura 22 - Percentagem de DPPH remanescente em função da concentração do extrato bruto de cereja Saco Colheita Tardia

O passo seguinte foi tentar obter um extrato com menos interferentes, ou seja, com os compostos fenólicos em estado mais puro. Por isso, procedeu-se a uma extração com solvente acidificado para tentar eliminar uma maior quantidade de açúcares e uma maior extração de antocianinas, compostos fenólicos considerados como fortes antioxidantes (Teixeira, L.N. et al, 2008). Este processo foi realizado com 99,9 % metanol e 0,1 % HCl. A figura 23 e 24 foi o resultado do extrato de cereja, também para a variedade Saco Colheita Tardia.

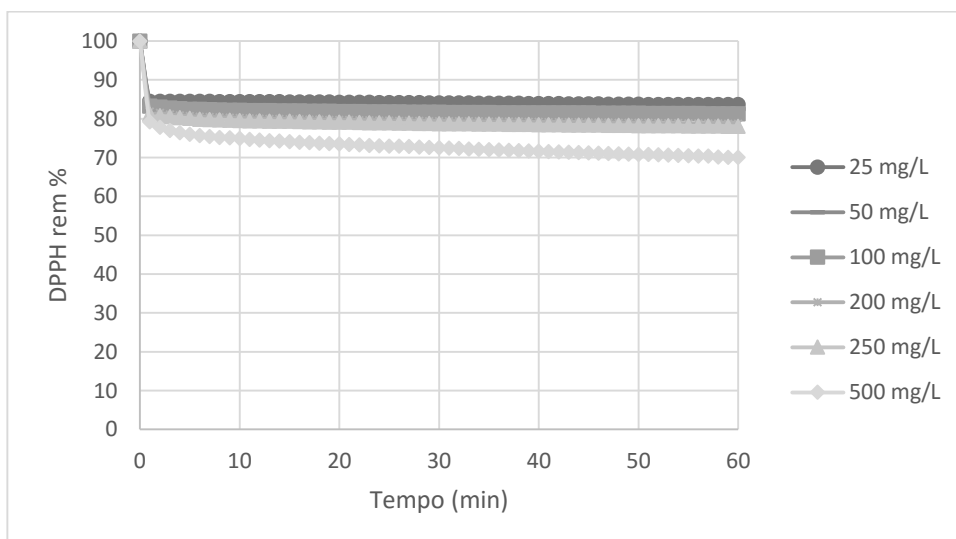


Figura 23 - Comportamento cinético do DPPH em função do tempo para o extrato bruto da variedade de cereja Saco Colheita Tardia

Mais uma vez pelas figuras 23 e 24 é possível visualizar que não se atinge a diminuição de 50 % de DPPH pretendida. Existe, contudo, uma maior diferença entre as várias

concentrações, a nível de atividade. Após os cálculos com a equação fornecida pela figura 24, obteve-se um EC50 de 921,81 mg/L, a qual continua a ser uma concentração elevada para um fruto descrito com alta capacidade antioxidante e é um valor que continua for das concentrações testadas.

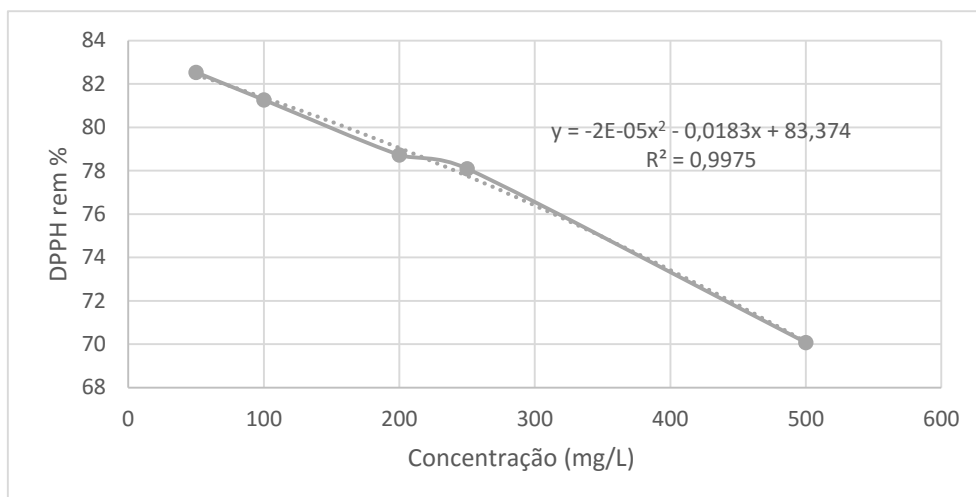


Figura 24 - Percentagem de DPPH remanescente em função da concentração do extrato bruto de cereja Saco Colheita Tardia

O passo seguinte desenvolveu-se mais uma vez, no sentido de eliminar, o mais possível, interferentes que os extratos brutos pudessem conter, concentrando ao mesmo tempo os compostos fenólicos. Este passo consistiu numa separação cromatográfica por troca aniónica descrita anteriormente.

Assim, a título de exemplo, apresentam-se os gráficos, figura 25 e 26, que mostram o cálculo da atividade antioxidante para o extrato purificado da variedade Saco Colheita Tardia obtidas a partir dos extratos puros, os quais foram realizados do mesmo modo para o cálculo de todas as outras variedades.

Na figura 25 é possível observar uma diminuição gradual do DPPH conforme o tempo vai passando, mas também em função da concentração de extrato, existindo diferenças significativas de concentração para concentração. Neste gráfico é ainda possível observar que é atingida a diminuição de 50 % da concentração inicial de DPPH.

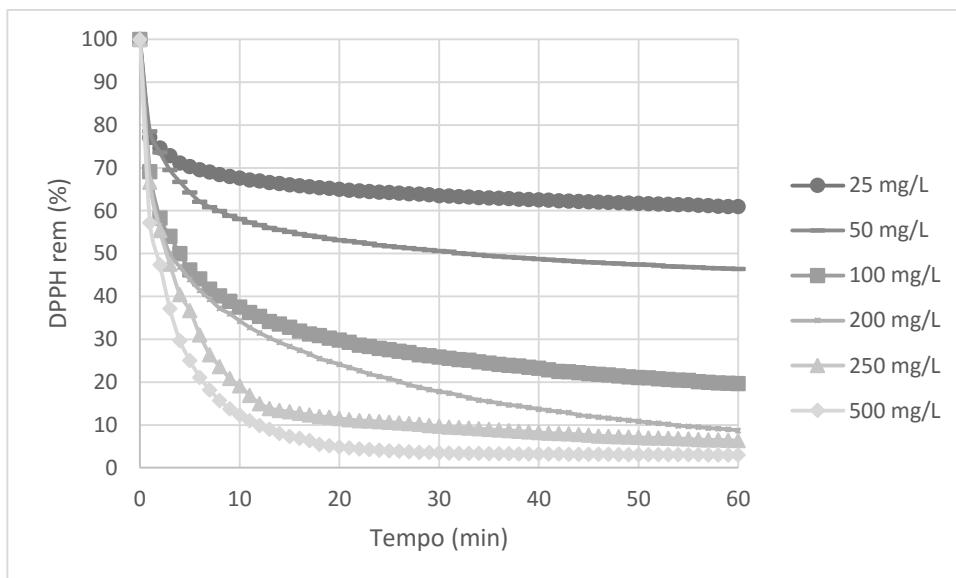


Figura 25 - Comportamento cinético do DPPH em função do tempo para o extrato purificado da variedade de cereja Saco Colheita Tardia

A figura 26 representa os valores de  $DPPH_{rem}$  quando  $t=60min$  em função da concentração dos extratos. Desta figura, obtém-se uma equação polinomial a qual permite o cálculo do EC50.

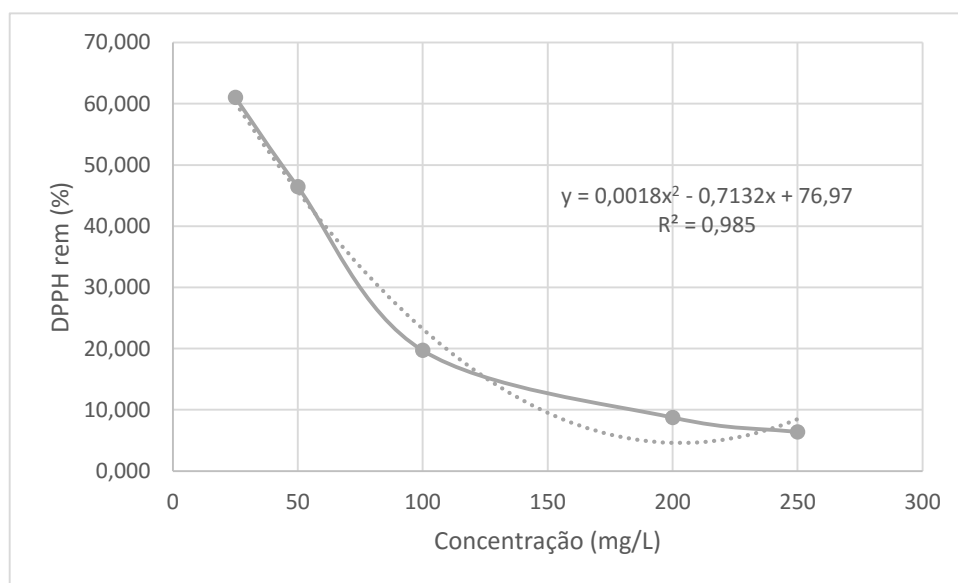


Figura 26 - Percentagem de DPPH remanescente em função da concentração de extrato purificado de Saco Colheita Tardia

Assim, para  $\%DPPH_{rem}=50$ , obtém-se uma concentração de 42,34 mg/L, o qual será o EC50, a concentração eficiente necessária para reduzir em 50 % a concentração inicial de DPPH.

Para as restantes variedades de cereja e padrões (trolox e quercetina), os cálculos foram efetuados da mesma forma. Os gráficos e cálculos são apresentados na seção de anexos.

Na figura 27 estão presentes os vários resultados obtidos para os extratos e padrões, onde se pode observar que a variedade de cereja com maior atividade antioxidante é a Saco Colheita Tardia e a que tem menos a Earlise, pois quanto maior o EC50 maior quantidade de extrato é necessário para diminuir a concentração de DPPH inicial em 50 %, logo menor será a capacidade antioxidante.

Comparando as variedades Saco, observa-se uma ligeira diferença, não sendo muito significativa. Existe contudo uma relação entre estes resultados e os resultados dos fenóis totais, sendo que existe uma correspondência, pois a variedade de cereja que contém um maior teor de fenóis é a variedade com uma maior atividade antioxidante e a variedade de cereja que contém um menor teor de fenóis é a variedade com uma menor atividade antioxidante. Esta relação não existe com os outros compostos, nomeadamente os flavonóides e antocianinas. No entanto, nas variedades Saco, esta correspondência entre a atividade antioxidante e compostos fenólicos não é significativa, pois apesar de quando comparadas com as outras variedades, as cerejas Saco terem bastantes fenóis, a atividade antioxidante não é muito diferente das restantes.

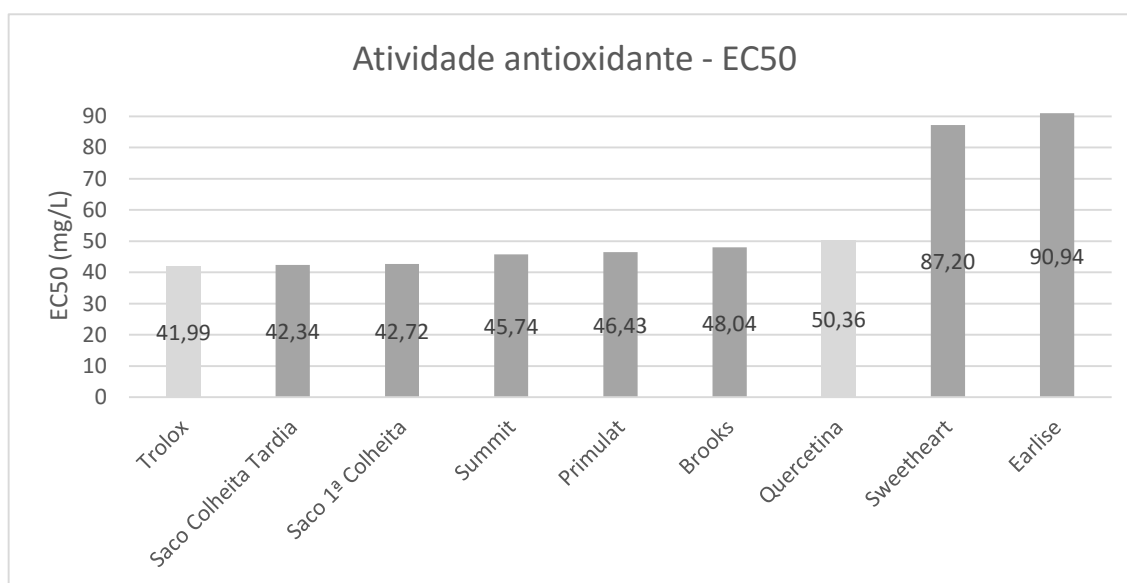


Figura 27 - Concentração eficiente (EC50) para cada variedade de extrato de cereja puro, sendo que não foram efetuados replicados por escassez de amostra purificada

Globalmente, a atividade antioxidante quando comparada com o padrão antioxidante trolox apresenta valores muito próximos para quase todas as variedades, o que mostra a elevada atividade antioxidante das cerejas. Os valores obtidos para os extratos de cereja, quando comparados com o padrão quercetina, têm valores mais altos o que pode ser explicado pelo facto da atividade antioxidante não se dever apenas aos flavonóides, como compostos individuais, mas também pode dever-se ao sinergismo de vários compostos existentes no extrato.

### 4.3. Atividade Antimicrobiana

O crescente aumento de resistências pelos microrganismos tem levado à procura de novos compostos com intuito de encontrar terapêuticas alternativas às convencionais. Considerando que tanto plantas e como frutos são fontes de diversos compostos químicos bioactivos, estes podem ser vistos como um alvo para a investigação científica na busca de novos substitutos dos agentes antimicrobianos sintéticos já conhecidos. Assim, e no seguimento desta dissertação, nesta secção encontram-se descritos os resultados obtidos no trabalho realizado com o intuito de investigar a atividade microbiológica dos extratos de cereja.

Nas metodologias aplicadas à avaliação do potencial antimicrobiano do extrato de cereja foi testado apenas o extrato de cereja Saco Colheita Tardia purificado, ou seja, o extrato recolhido após a purificação, no qual foram removidos a maioria dos compostos interferentes, nomeadamente açúcares. O extrato Saco Colheita Tardia foi o extrato selecionado devido ao seu elevado conteúdo em compostos fenólicos, flavonóides, antocianinas, assim como maior atividade antioxidante, quando comparado com os outros extratos testados.

#### 4.3.1. Concentração mínima inibitória

A avaliação da concentração mínima inibitória foi feita de acordo com a técnica de diluição em meio líquido que permitiu a determinação de valores de CMI dos extratos, mas também do antibiótico usado que atuou como controlo do método.

Considerando os resultados obtidos para a determinação das concentrações mínimas inibitórias (tabela 7), verificou-se que o extrato purificado de cereja utilizado apenas apresentou atividade antimicrobiana, no intervalo testado, contra uma das bactérias testadas, neste caso uma bactéria Gram negativa, *Klebsiella pneumoniae*. Considerando que, esta bactéria é um agente patogénico oportunista, responsável por cerca de 10 % das infeções

bacterianas hospitalares, apresentando uma taxa de mortalidade de cerca de 50 % (Huyh, D. T. N. et al, 2015), a inibição do seu crescimento pelo extrato de cereja apresenta relevância, nomeadamente a nível hospitalar.

Os resultados indicam ainda que seriam necessárias concentrações superiores de extrato para inibir o crescimento visível das restantes bactérias Gram positivas e Gram negativas e da levedura em estudo. Assim, verificou-se que o extrato purificado de cereja apresenta uma fraca atividade antimicrobiana contra os microrganismos testados.

Não é possível comparar estes resultados com outros já descritos na literatura, uma vez que não existem estudos efetuados em cerejas na área de microbiologia. Atualmente tem existido um crescente interesse na atividade antimicrobiana de extratos de frutos, especialmente dos frutos vermelhos, pois têm na sua constituição compostos com elevada atividade antioxidante. Assim diversos autores, cujos estudos se têm focado nesta área, obtiveram resultados com frutos que demonstraram inibir diversos microrganismos. No caso da romã em particular, este fruto consegue inibir o crescimento de *S.aureus*, *MRSA* e *E. coli* com concentrações de 250 µg/mL, enquanto para *C. albicans* não conseguiram determinar a CMI, tendo testado concentrações até 1 mg/mL (Bakkiyaraj, D. et al, 2013). No presente trabalho, verificou-se que possivelmente seriam necessárias concentrações mais elevadas de extrato de cereja para obter CMI para os mesmos microrganismos, sendo que foram testadas concentrações até 10 mg/mL e não foram determinadas as CMI.

Quanto ao facto de o extrato de cereja conseguir inibir uma bactéria Gram negativa, mas não bactérias Gram positivas é compatível com estudos realizados em extratos de bagas finlandesas cujos resultados são semelhantes. No estudo realizado por Puupponen-Pimiä, R. e seus colaboradores, os resultados obtidos mostraram que os frutos arando, mirtilo, framboesa e morango conseguem inibir o crescimento das bactérias Gram negativas testadas (várias estirpes de *Salmonella* e *E.coli*), mas não das Gram positivas (várias estirpes de *Lactobacillus*). Tais resultados demonstram que no geral as bactérias Gram negativas mostraram uma maior sensibilidade para os extratos do que as bactérias Gram positivas (Puupponen-Pimiä, R. et al, 2001).

Autores referem ainda que não existe qualquer correlação entre a categoria de Gram positivas e Gram negativas e a suscetibilidade das mesmas a mirtilo e framboesa (Burdulis, D. et al, 2009).

Relativamente aos resultados de controlo realizado com antibióticos, que se encontram descritos na tabela 7, todos os microrganismos são suscetíveis ao antibiótico tetraciclina, encontrando-se os valores de acordo com os intervalos de valores estabelecidos pela norma M7-A9. O resultado referente a *C. albicans* indica que esta é suscetível ao antibiótico anfotericina-β, encontrando-se o valor dentro dos resultados estabelecidos pela norma M27-A3.

Tabela 7 - Concentrações mínimas inibitórias dos extratos e antibióticos (anfotericina B e tetraciclina)

Microrganismos	Estirpes	CMI (mg/mL)	
		Extrato	Antibiótico
Gram Positivas	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	>10	0,25
	<i>MRSA - S.aureus</i>	>10	0,5
	<i>Listeria monocytogenes</i> LMG 16775	>10	0,5
Gram Negativas	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	5	2
	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	>10	1
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	>10	8
Leveduras	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	>10	0,5

ATCC - “American Type Culture Collection”

#### 4.3.2. Ensaios avaliação da potenciação da atividade de um antibiótico

O sinergismo é um efeito combinatório entre duas substâncias, onde o efeito das duas é maior do que a soma do efeito produzido por elas em separado. Neste caso, a metodologia prática usada para a avaliação de sinergismo entre compostos na inibição de microrganismos, é utilizada para verificar se existe um aumento do efeito da ação do antibiótico tetraciclina pelo extrato. Para a plena eficácia desta metodologia é necessário conhecer a concentração mínima inibitória das duas substâncias a testar. Como neste caso, não foi possível calcular o CMI do extrato para a maioria dos microrganismos, esta metodologia serviu simplesmente para avaliar o efeito do extrato sobre o CMI do antibiótico.

Tabela 8 - Concentrações mínimas inibitórias do antibiótico e combinação para *S.aureus* e *P.aeruginosa*

µg/mL	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
CMI (antibiótico)	0,5	8
CMI (combinatório - Extrato+Antibiótico)	0,125	4

Como é possível observar na tabela 8, existe um efeito do extrato na CMI do antibiótico, tal significa que, em conjunto com o extrato, o antibiótico consegue exercer o seu efeito de

inibição do crescimento sobre o microrganismo em concentrações mais baixas, ocorrendo assim uma potenciação da atividade da tetraciclina pelo extrato. O efeito sinérgico de compostos fenólicos, nomeadamente os flavonóides, com antibióticos foi descrito anteriormente. Tal verifica-se num estudo realizado por Wang e co-autores (2013), onde se observou que os flavonóides de uma planta (*Sophora moorcroftiana*) atuavam com antibióticos, como a gentamicina e norfloxacin, num efeito sinérgico contra estirpes de *S. aureus*.

Segundo Venter, H. et al. (2015) estes resultados significam que o extrato de cereja cumpre um dos requisitos para poder ser um bom inibidor de bombas de efluxo, uma vez que poderá atuar sinérgicamente com o antibiótico tetraciclina.

#### 4.3.3. Avaliação do papel de bombas de efluxo na resistência ao extrato de cereja

As bombas de efluxo são um dos principais mecanismos de resistência das bactérias, uma vez que estas retiram as substâncias tóxicas das células. Considerando a baixa ação do extrato sobre as bactérias em estudo, de seguida procedeu-se à avaliação do papel de bombas de efluxo na resistência ao extrato de cereja. Como tal, efetuou-se o método de diluições sucessivas para a determinação da CMI do extrato na presença de um conhecido inibidor de bombas de efluxo, verapamil.

Tabela 9 - Concentrações mínimas inibitórias de verapamil e do extrato em conjunto com o inibidor

	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
CMI (verapamil)	800 µg/mL	>800 µg/mL
CMI (extrato+verapamil)	>10 mg/mL extrato +400µg/mL verapamil	>10 mg/mL extrato +400µg/mL verapamil

A tabela 9 resume os resultados obtidos nesta metodologia, sendo que foi determinada a CMI de verapamil com o intuito de selecionar uma concentração deste composto que não interferisse no crescimento das bactérias em estudo, e assim pudesse ser usada no ensaio inibindo as bombas de efluxo sem interferência no crescimento. Durante a realização do ensaio confirmou-se, ainda, que para concentrações inferiores a 800 µg/mL de verapamil, não ocorria inibição visível de crescimento quando comparado com o controlo positivo de crescimento.

Relativamente ao extrato, quando determinadas as CMI para o extrato, no caso do *S. aureus* para a concentração mais alta testada (10 mg/mL) verificou-se uma ligeira diminuição do crescimento, o que levaria a crer que no caso de ocorrer resistência ao extrato pelas bombas de efluxo, por adição de um inibidor destes sistemas, poder-se-ia determinar uma CMI. No entanto, pelos resultados obtidos verifica-se que tal não ocorreu. Estes factos dificultam uma

conclusão, no entanto, os resultados desta metodologia indiciam que as bombas de efluxo não têm um papel preponderante na resistência ao extrato.

Existem, no entanto, estudos com plantas ricas em antocianinas e flavonóides, realizados por Noumedem, J. AK. (2013), que na presença do inibidor de bombas de efluxo fenilalanina-arginina  $\beta$ -naftilamina (PaBN) conseguem aumentar a atividade inibitória de crescimento do extrato contra de *Providencia stuartii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *E. coli*, *Enterobacter aerogenes* e *Enterobacter cloacae*, uma vez que o inibidor bloqueia as bombas de efluxo e estas não conseguem remover os extratos das plantas.

#### 4.3.4. Avaliação da inibição do processo de *Quorum-sensing* (QS)

A atividade do extrato sobre o mecanismo de virulência QS foi testado, pois apesar de não existir inibição do crescimento, pode existir atividade do extrato sobre os mecanismos de virulência (Chenia, H. Y., 2013). O microrganismo utilizado nas metodologias de avaliação de inibição do mecanismo de *quorum sensing* é a bactéria *Chromobacterium violaceum*. Esta é uma bactéria biosensor de referência usada para detetar possíveis inibidores do *quorum sensing*, dado que produz um pigmento de cor púrpura, chamado violaceína, cuja produção é controlada por este sistema.

Para avaliação do potencial de inibição do mecanismo de QS pelos extratos em estudo procedeu-se a uma metodologia qualitativa (figura 28 e 29) e uma quantitativa (figura 30).

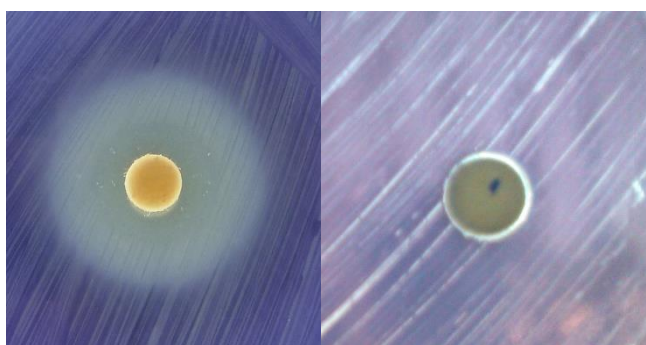


Figura 28 - Controlo positivo de resveratrol e controlo negativo de DMSO

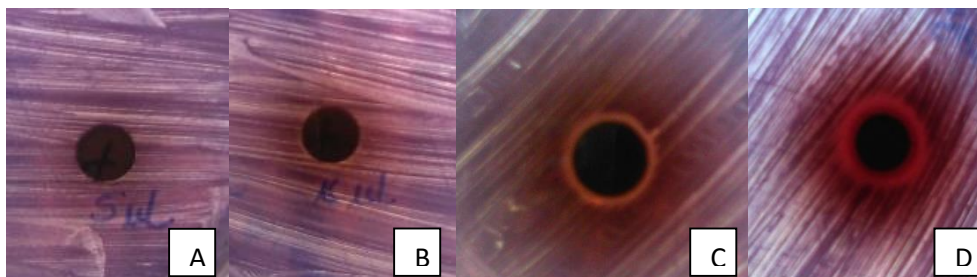


Figura 29 - Ensaio com discos inoculados com extrato de cereja purificado: A - 5 $\mu$ L de extrato; B - 15  $\mu$ L de extrato; C - 20  $\mu$ L de extrato; D - 40  $\mu$ L de extrato

No ensaio qualitativo pretende-se observar se em torno do disco há formação de um halo, não de inibição do crescimento, mas sim um halo de inibição da produção de pigmento, sendo que quanto maior for este halo, maior será a atividade de inibição do QS e consequentemente inibição da produção de violaceína. Como é possível observar na figura 28, para o controlo negativo de DMSO (solvente do extrato) não se verifica a formação de halo. Quanto ao controlo positivo, onde se usou um descrito inibidor de QS, o resveratrol (Duarte, A. D. et al, 2015), é possível observar a formação de dois halos, sendo o halo interior correspondente à inibição do crescimento e o halo exterior um halo de inibição da produção do pigmento violaceína por *C. violaceum*. Assim, sendo é possível afirmar que o resveratrol, um componente natural proveniente de plantas, consegue inibir o mecanismo de *quorum sensing* do microrganismo *C. violaceum*, tal como descrito anteriormente (Duarte, A. D. et al, 2015).

Observando a figura 29, é possível referir que apenas quando é adicionado 20 e 40  $\mu$ L de extrato de cereja aos discos, existe a formação de um halo de diâmetro reduzido, correspondente a um halo de inibição do crescimento e não de inibição do pigmento. Assim sendo, a partir da avaliação qualitativa de inibição do mecanismo de *quorum sensing* sugere-se que o extrato não tem atuação sobre este mecanismo. Este comportamento foi de seguida avaliado através de uma metodologia quantitativa de produção de violaceína.

O intervalo de concentrações de extrato utilizado nesta metodologia de avaliação da inibição do processo de QS e nas seguintes foi de 0,625 - 0,078 mg/mL. Estas concentrações foram selecionadas com o intuito de diminuir ao máximo a interferência da cor do extrato nos ensaios, mas também considerando que extratos de plantas têm sido descrito como inibindo a expressão de fatores de virulência em concentrações baixas mesmo sem capacidade de inibição de crescimento (Kim, H. e Park, H., 2013).

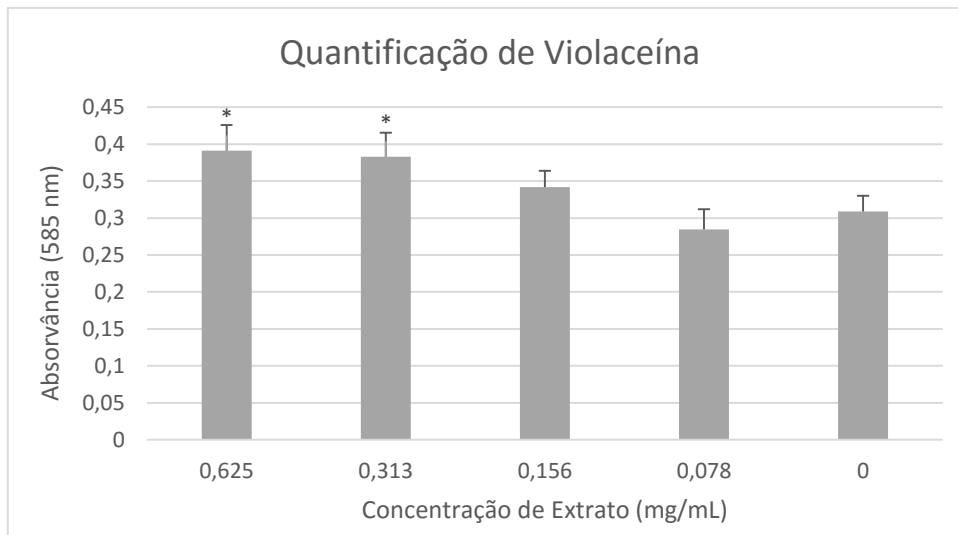


Figura 30 - Quantificação dos efeitos do extrato purificado de cereja na produção de violaceína por *C.violaceum*. Os asteriscos demonstram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) quando comparando com o ensaio com o respetivo controlo (0 mg/mL)

Os resultados obtidos estão apresentados na figura 30, verificando-se que quando comparado com o controlo, somente para a menor concentração de extrato de cereja existe uma ligeira inibição da produção de pigmento, no entanto, sem apresentar uma diferença significativa com o controlo. De referir ainda que para as maiores concentrações de extrato (0,625 e 0,313 mg/mL), existe um aumento significativo da produção de violaceína ( $P < 0,05$ ).

Existem, no entanto, estudos com frutos com constituintes similares aos da cereja que demonstraram ter atividade sobre o mecanismo de QS. Um exemplo é o estudo realizado por Chenia, H. Y. (2013) com extratos do fruto *Kigelia africana*, o qual tem na sua constituição flavonóides e outros compostos, e apresentou um efeito bastante acentuado sobre o este mecanismo, inibindo a produção de violaceína com percentagens entre 5-98,28%.

Como tal, estes resultados mostram que o extrato de cereja purificado não tem um papel como inibidor do mecanismo de QS.

#### 4.3.5. Avaliação da produção de piocianina e de pioverdina

O microrganismo *P. aeruginosa* é considerado um microrganismo modelo para avaliar a inibição de mecanismos de virulência (Hossain, M. A. et al, 2015). Neste caso, a piocianina e a pioverdina são dois importantes fatores de virulência do microrganismo *P. aeruginosa*, os quais têm um papel vital em infecções e contribuem portanto para a sua patogenicidade. Estes fatores são também bastante estudados pelo facto de serem pigmentos de cor verde e azul, o que facilita o estudo da produção destes.

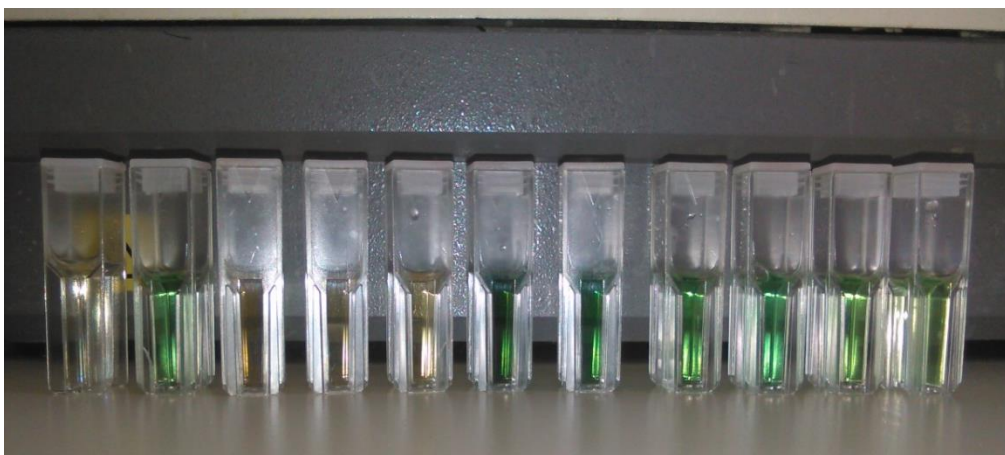


Figura 31 - Sobrenadantes antes da leitura no espectofotómetro (branco, controlo positivo, controlos de extrato (0,313; 0,152; 0,078), ensaios com extrato de cereja (0,313; 0,152; 0,078); ensaio com DMSO (0,313; 0,152; 0,078)

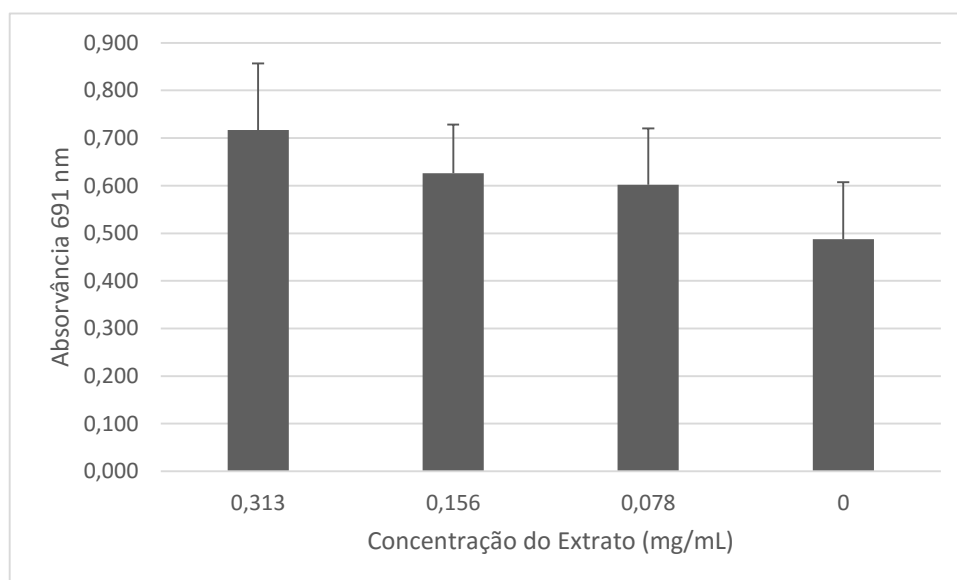


Figura 32 - Avaliação dos efeitos do extrato purificado de cereja na produção de piocianina por *P. aeruginosa*. Os asteriscos demonstram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) quando comparando com o ensaio com o respetivo controlo (0 mg/mL)

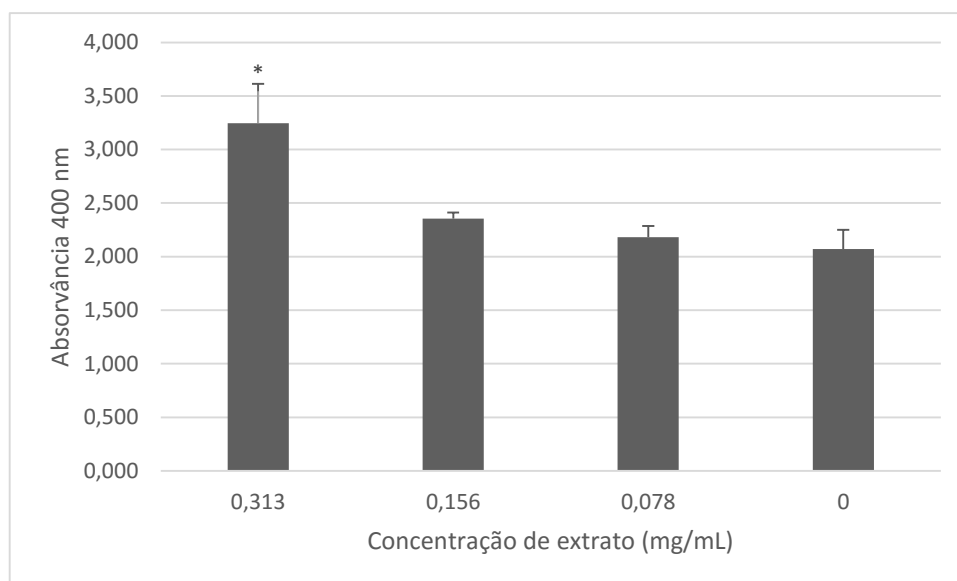


Figura 33 - Análise dos efeitos do extrato purificado de cereja na produção de pioverdina por *P.aeruginosa*. Os asteriscos demonstram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) quando comparando com o ensaio com o respetivo controlo (0 mg/mL)

De acordo com os dados experimentais obtidos (figura 32 e 33), verifica-se que existe um aumento da produção tanto de piocianina como de pioverdina, sendo que existe um aumento mais significativo de pioverdina do que de piocianina. A incubação das células de *P. aeruginosa* com as concentrações testadas de extrato de cereja purificado não demonstrou levar a uma alteração significativa da produção de piocianina quando comparado com o controlo sem extrato. No entanto, quanto à produção de pioverdina, existe apenas uma diferença significativa quando a concentração de extrato de cereja é de 0,313 mg/mL, o que significa que a esta concentração ou a concentrações mais elevadas, o extrato de cereja, despoleta a produção deste fator de virulência de modo significativo quando comparado com o controlo. Isto está de acordo com o obtido anteriormente no ensaio de avaliação da inibição do QS, dado que a produção destes fatores de virulência é regulado pelo QS (Kalia, M. et al, 2015). Anteriormente outros compostos naturais, demonstraram ter capacidade de inibir a produção destes pigmentos, como é apresentado no estudo de Husain e seus colaboradores, onde o óleo de *Mentha piperita* e o mentol demonstraram atividade sobre este mecanismo de virulência (Husain, F. M. et al, 2015).

#### 4.3.6. Avaliação da influência na motilidade de tipo “swarming”

O microrganismo *P. aeruginosa* está descrito como tendo motilidade e é um microrganismo de referência para ensaios de “swarming”, sendo que este mecanismo de virulência poderá estar relacionado com a formação de biofilmes (Ulrey, R. K. et al, 2014).

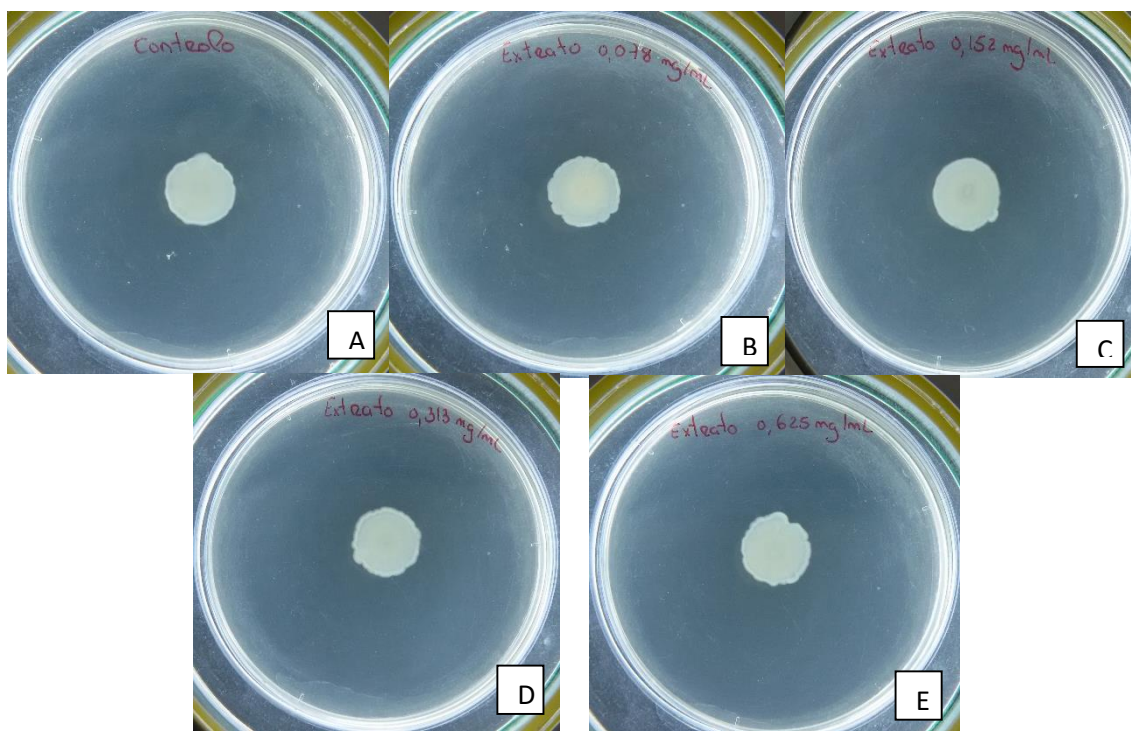


Figura 34 - Ensaios de “swarming” - A: Controle; B: Ensaio com extrato com concentração 0,08 mg/mL; C: Ensaio com extrato com concentração 0,152 mg/mL; D: Ensaio com extrato com concentração 0,313 mg/mL; E: Ensaio com extrato com concentração 0,625 mg/mL

Na figura 34 e tabela 10 é possível observar os resultados obtidos através do método usado para a avaliação da influência do extrato de cereja purificado na motilidade do tipo “swarming” em *P. aeruginosa*, verificando-se que não existe uma alteração significativa no “swarming”, independentemente da concentração de extrato adicionado, quando comparado com o controle. Dado que, a motilidade do tipo “swarming” é regulada pelo mecanismo de *quorum sensing* (Kazemian, H. et al, 2015), estes resultados apresentam-se como consistentes com os anteriores, uma vez que o extrato não exibe influência sobre este mecanismo, não se verificando, no entanto, um aumento do “swarming” com o aumento da concentração de extrato.

Tabela 10 - Diâmetros dos halos de “swarming”, medidos em duas direções, média± desvio padrão

	Média do diâmetro do halo (cm) ± desvio padrão
Controlo	1,59±0,043
Extrato (0,078 mg/mL)	1,53±0,233
Extrato (0,152 mg/mL)	1,58±0,202
Extrato (0,313 mg/mL)	1,55±0,055
Extrato (0,625 mg/mL)	1,5±0,025

Apesar dos resultados obtidos neste estudo, segundo Ulrey e seus colaboradores, as pro-antocianidinas presentes no fruto de arando diminuem a motilidade do tipo “swarming” tanto na distância como na complexidade do padrão de “swarming” (Ulrey, R. K. et al, 2014). Também o mirtilo, a framboesa, a uva e o morango demonstraram atividade anti- “swarming” contra *P. aeruginosa* (Vattem, D.A. et al, 2007). No entanto, tanto os extratos de arando, como os extratos de mirtilo, framboesa, uva e morango, não têm na sua composição química a mesma quantidade açúcares que os extratos de cereja, o que pode ter influenciado negativamente os resultados do extrato de cereja sobre a motilidade de tipo “swarming”. Isto poderá ocorrer, pois este tipo de motilidade é dependente do movimento flagelar e portanto dependente de energia. Assim, os açúcares ainda presentes nos extratos de cereja poderão atuar como fonte de energia para o movimento da bactéria (Ben-Jacob, E. et al, 2016).

#### 4.3.7. Formação de biofilmes

Os biofilmes formados por agentes patogénicos, fungos e bactérias, são uma grande preocupação a nível hospitalar e não só, devido à resitência que os biofilmes conferem aos microrganismos. No entanto, terapia efetivas contra os biofilmes, como alvo, são escassas (Bakkiyaraj, D. et al, 2013).

Os microrganismos usados para esta metodologia foram *S.aureus* (Gram positiva) e *P.aeruginosa* (Gram positiva), pois são duas bactérias, cujas infeções adquiridas a nível hospitalar e na comunidade, estão bem caracterizadas e têm sido apresentadas como modelos de estudo de inibição de formação de biofilmes (Mabhiza, D. et al, 2015, Ulrey, R. K. et al, 2014).

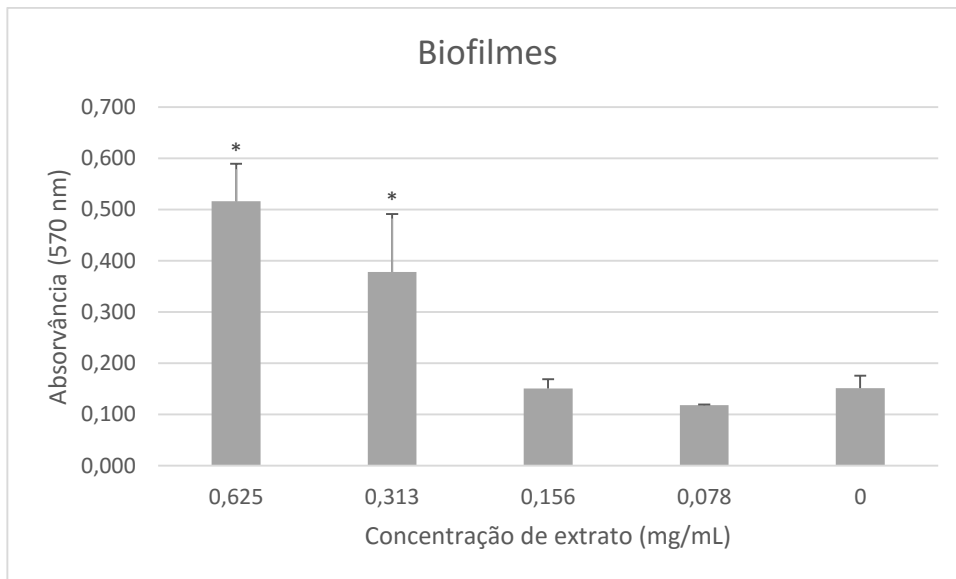


Figura 35 – Avaliação do efeito do extrato de cereja purificado sobre a formação de biofilmes de *S. aureus*. Os asteriscos demonstram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) quando comparando com o ensaio com o respectivo controlo (0 mg/mL)

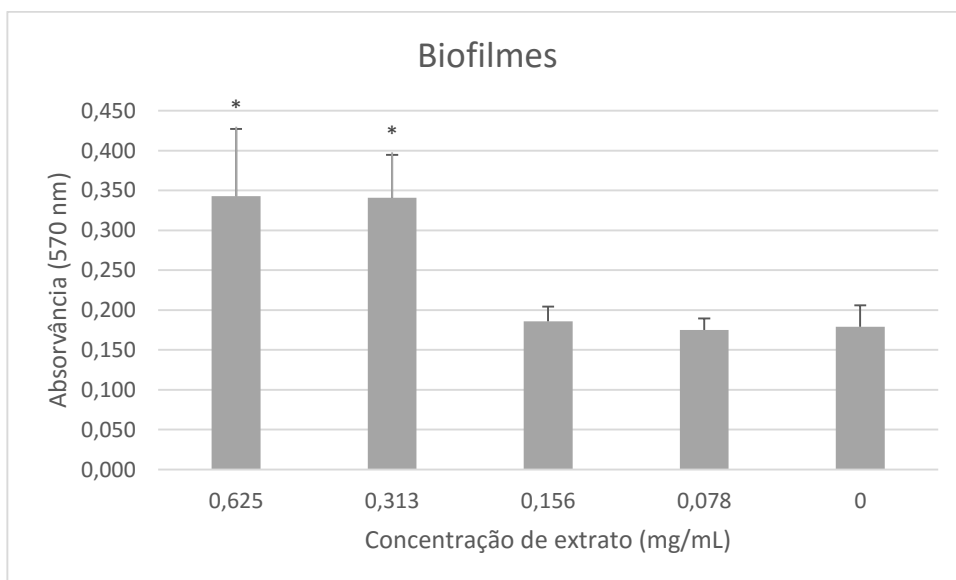


Figura 36 - Avaliação do efeito do extrato de cereja purificado sobre a formação de biofilmes de *P. aeruginosa*. Os asteriscos demonstram diferenças significativas ( $P < 0,05$ ) quando comparando com o ensaio com o respectivo controlo (0 mg/mL)

A figura 35 e 36 contêm os resultados obtidos para o ensaio de inibição de formação de biofilmes por *S. aureus* e *P. aeruginosa* para concentrações de extrato inferiores a 0,625 mg/mL. Estes resultados demonstram que o extrato de cereja apenas afeta a formação dos biofilmes, inibindo-a, quando as concentrações de extrato são baixas (0,078 mg/mL para *P. aeruginosa* e 0,078 - 0,156 mg/mL para *S. aureus*), no entanto sem diferença significativa. Para concentrações mais elevadas (0,625 e 0,313 mg/mL), o extrato de cereja potencia significativamente a formação dos biofilmes ( $P < 0,05$ ). Estes resultados não são satisfatórios, no entanto tal pode dever-se a compostos presentes no extrato que sejam interferentes, nomeadamente os açúcares, pois apesar de o extrato passar previamente por uma etapa de purificação, os açúcares não são removidos na sua totalidade.

A utilização de extratos de frutos tem demonstrado ter capacidade antibiofilmes, com diversos estudos suportando este potencial. Bakkiyaraj e co-autores apresentaram estudos com a romã, rica em compostos fenólicos, revelando que este fruto atua na formação de biofilmes, assim como na disrupção de biofilmes pré-formados por *S. aureus*, *MRSA*, *E. coli* e *Candida albicans* (Bakkiyaraj, D. et al, 2013). Também Ulrey e colaboradores demonstraram que o arando, cuja constituição tem um elevado teor em antocianinas, atua eficazmente sobre biofilmes produzidos por *P. aeruginosa* (Ulrey, R.K. et al, 2014).

Os vários resultados obtidos estão em concordância entre si (pontos 4.5.4., 4.5.5. e 4.5.6), isto pode ocorrer pois é o mecanismo de *quorum sensing* que regula os mecanismos de virulência estudados, neste caso, a produção de piocianina e pioverdina, a motilidade de tipo “*swarming*” e a formação de biofilmes. Logo, dado que o extrato de cereja apenas atua sobre o *quorum sensing* em concentrações mais baixas, é concordante que apenas concentrações mais baixas de extrato atenuem estes mecanismos, no entanto sem significância. Relativamente a concentrações mais altas de extrato verificou-se que estas potenciam a formação de pigmento violaceína, e como tal, potenciam o *quorum sensing*, sendo concordante então que tenham a mesma ação também na formação de biofilmes e na produção de piocianina e pioverdina.

Considerando, os estudos prévios realizados com frutos ricos em compostos fenólicos e o perfil de composição química obtido para a cereja seria de esperar que este fruto obtivesse algum tipo de atividade na inibição da formação de biofilmes, no entanto, tal não se verificou. Estes resultados podem dever-se à existência de compostos interferentes presentes no extrato de cereja purificado, cuja atividade tenha um efeito antagonístico com os compostos fenólicos.

## 5. Conclusões e perspectivas futuras

O trabalho desenvolvido teve como principal objetivo a caracterização fitoquímica e a avaliação biológica, através da determinação das atividades antioxidante e antimicrobiana, de extratos de cereja. Assim os estudos efetuados ao longo deste trabalho permitiram um melhor conhecimento acerca da constituição fitoquímica da cereja, nomeadamente a sua composição em fenóis totais, flavonóides totais, antocianinas totais e açúcares redutores, e permitindo ainda avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos de cereja, em particular no caso da atividade antimicrobiana, testando as CMI para vários microrganismos e testando vários mecanismos de virulência.

Assim, as conclusões deste trabalho, quanto ao conteúdo de compostos fenólicos, foram que a variedade de cereja Saco Colheita Tardia contém um maior teor de fenóis e a variedade Earlise tem um menor teor. Para os flavonóides, também a Saco Colheita Tardia tem um teor mais elevado destes compostos, enquanto a Sweetheart é a variedade que tem menos flavonóides. Relativamente às antocianinas, mais uma vez a variedade Saco Colheita Tardia é a que tem um teor, destes compostos, mais elevado, sendo que a Earlise é a que tem o menor teor. Nos açúcares redutores, a variedade de cereja Sweetheart é a variedade com mais açúcares redutores enquanto a Earlise é a que tem menos. Estes resultados demonstram que existe uma relação entre o grau de maturação da cereja e a quantidade de compostos bioativos presentes na mesma, uma vez que o extrato de cereja com um grau de maturação mais elevado (Saco Colheita Tardia) foi o extrato de cereja com um teor mais elevado destes compostos.

Na avaliação da atividade biológica, nomeadamente a atividade antioxidante pelo método de DPPH, verificou-se que os vários extratos de cereja têm uma atividade antioxidante bastante elevada e próxima do padrão trolox. Assim, para estes parâmetros (composição fitoquímica e atividade antioxidante) o extrato de cereja que apresentou um maior teor de compostos e atividade antioxidante foi o extrato de cereja Saco Colheita Tardia, razão pela qual este foi escolhido para os testes de avaliação de atividade antimicrobiana.

Para avaliar a atividade antimicrobiana foi testada a suscetibilidade de sete microrganismos diferentes ao extrato de cereja Saco Colheita Tardia, verificando-se que este apenas mostrou atividade contra o microrganismo *Klebsiella pneumoniae* com uma CMI de 5 mg/mL, sendo que para os restantes microrganismos, a CMI é > 10 mg/mL. Como tal procedeu-se então à avaliação de vários mecanismos de virulência para analisar a atividade do extrato sobre estes, independentemente da inibição de crescimento. O extrato de cereja purificado não demonstrou qualquer atividade contra mecanismos de virulência. Contudo, para concentrações altas (0,625-0,313 mg/mL), o extrato de cereja potenciava estes mecanismos. Para concentrações mais baixas (0,156-0,078 mg/mL), o extrato consegue ter alguma atividade, na inibição da formação de biofilmes, no entanto, esta não é significativa, o que torna estes resultados pouco satisfatórios.

Assim, conclui-se que o extrato de cereja apesar de não demonstrar atividade antimicrobiana, nem a nível de inibição do crescimento nem dos mecanismos de virulência, contém, no entanto, uma elevada quantidade de compostos fenólicos, o que tornam este fruto bastante rico, a nível nutricional, principalmente pela sua atividade antioxidante. Dado o forte poder antioxidante dos vários extratos de cereja testados, seria importante avaliar outras atividades biológicas relacionadas com esta atividade, nomeadamente a atividade anti-inflamatória. Atendendo ainda às características antioxidantes encontradas seria interessante que estudos futuros se centrassem nesta característica procurando uma forma de utilizar os compostos deste fruto, com o intuito de uma possível aplicação nutracêutica ou a nível da indústria alimentar.

Seria ainda importante em estudos futuros, realizar a caracterização fitoquímica com isolamento e identificação de compostos puros, os quais deveriam ser avaliados relativamente à sua actividade antimicrobiana.

## 6.Referências

Arendt, Philipp; Pollier, Jacob; Callewaert, Nico; Goossens, Alain; (2016) “*Synthetic biology for production of natural and new-to-nature terpenoids in photosynthetic organisms*” ; The Plant Journal - 86(2):1-11

Bakkiyaraj, Dhamodharan; Nandhini, Janarthanam Rathna; Malathy, Balakumar; Pandian, Shunmugiah Karutha; (2013) “*The anti-biofilm potential of pomegranate (Punica granatum L.) extract against human bacterial and fungal pathogens*”; Biofouling - 29(8): 929-937

Bandar, Hanan; Hijazi, Akram; Rammal, Hassan; Hachem, Ali; Saad, Zeinab; Badran, Bassam; (2013) “*Techniques for the extraction of bioactive compounds from Lebanese Urtica dioica*”; American Journal of Phytomedicine and Clinical Therapeutics - 1(6): 507-513

Baskan, Kevser Sözgen; Tütem, Esmâ; Akyüz, Esin; Özen, Seda; Apak, Resat; (2016) “*Spectrophotometric total reducing sugars assay based on cupric reduction*”; Talanta - 147: 162-168

Bastos, Claudete; Barros, Lillian; Dueñas, Montserrat; Calheta, Ricardo C.; Queiroz, Maria João R.P.; Santos-Buelga, Celestino; Ferreira, Isabel C.F.R.; (2015) “*Chemical characterization and bioactive properties of Prunus avium L.: The widely studied fruits and the unexplored stems*”; Food Chemistry - 173: 1045-1053

Ben-Jacob, Eshel; Finkelshtein, Alin; Ariel, Gil; Ingham, Colin; (2016) “*Multispecies swarms of social microorganisms as moving ecosystems*”; Trends in Microbiology - 24(4): 257-269

Burdulis, Deiviadas; Sarkinas, Antanas; Jasutienė, Ina; Stackevicienė, Elicija; Nikolajevs, Laurynas; Janulis, Valdimaras; (2009) “*Comparative study of anthocyanin composition, antimicrobial and antioxidant activity in bilberry (Vaccinium Myrtillus L.) and blueberry (Vaccinium Corymbosum L.) fruits*”; Natural Drugs - 66(4): 399-408

Cicco, Nunzia; Lanorte, Maria T.; Paraggio, Margherita; Viggiano, Mariassunta; Lattanzio, Vincenzo; (2009) “*A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts*”; Microchemical Journal - 91: 107-110

Chenia, Hafizah Y.; (2013) “*Anti-quorum sensing potential of crude Kigelia africana fruit extracts*”; Sensors - 13: 2802-2817

Chirinos, Rosana; Rogez, Hervé; Campos, David; Pedreschi, Romina; Larondelle, Yvan; (2007) “*Optimization of extraction conditions of antioxidant phenolic compounds from mashua (Tropaeolum tuberosum Ruiz & Pavon) tubers*”; Separation and Purification Technology - 55(2):217-225

Dai, Jin; Mumper, Russell J.; (2010) “*Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties*”; *Molecules* - 15: 7313-7352

Delfanian, Mojtaba; Kenari, Reza Esmailzadeh; Sahari, Mohammad Ali; (2015) “*Influence of extraction techniques on antioxidant properties and bioactive compounds from loquat fruit (Eriobotrya japonica Lindl.) skin and pulp extracts*”; *Food Science and Nutrition* - 3(3): 179-187

Demirdöven, Ashhan; Karabiyikli, Seniz; Tokatli, Kader; Öncül, Nilgün; (2015) “*Inhibitory effects of red cabbage and sour cherry pomace anthocyanin extracts on food borne pathogens and their antioxidant properties*”; *Food Science and Technology* - 63:8-13

Dias, Cláudia Sofia Lourenço (2012) “*A fileira da cereja da Cova da Beira*”; 111 páginas  
Dissertação (mestrado em Fruticultura Integrada) - Instituto Politécnico de Castelo Branco - Escola Superior Agrária

Donlan, Rodney M.; (2001) “*Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process*”; *Clinical infectious diseases* - 33:1387-1392

Duarte, Ana Paula; Alves, Ana C.; Ferreira, Susana; Silva, Filomena; Domingues, Fernanda C.; (2015) “*Resveratrol inclusion complexes: Antibacterial and anti-biofilm activity against Campylobacter spp. And Arcobacter butzleri*”; *Food Research International* - 77:244-250

Federle, Michael J.; Bassler, Bonnie L.; (2003) “*Interspecies communication in bacteria*”; *The Journal of Clinical Investigation* - 112(9): 1291-1299

Ferretti, Gianna; Bacchetti, Tiziana; Belleggia, Alberto; Neri, Davide; (2010) “*Cherry Antioxidants: from farm to table*”; *Molecules* - 15(10): 6993-7005

Habib, Muzammil; Bhat, Mudassir; Dar, B.N.; Wani, Ali Abas; (2015) “*Sweet cherries from farm to table: A review*”; *Food Science and Nutrition* - 55: 1-43

Haminiuk, Charles W.I.; Maciel, Giselle M.; Plata-Oviedo, Manuel S.V.; Peralta, Rosane M.; (2012) “*Phenolic compounds in fruits - na overview*”; *Food Science and Technology* - 47: 2023-2044

Hanbali, Lama B.; Ghadieh, Rana M.; Hasan, Hiba A.; Nakhal, Yasmine K.; Haddad, John J.; (2013) “*Measurement of antioxidant activity and antioxidant compounds under versatile extraction conditions: I. The immunobiochemical antioxidant properties of sweet cherry (Prunus avium) extracts*”; *Anti-inflammatory & anti-allergy agents in medicinal chemistry* - 12: 173-187

Hayaloglu, Ali Adnan; Demir, Nurullah; (2015) “*Phytochemical characteristics, antioxidant activity, organic acid and sugar contents of 12 sweet cherry (Prunus avium L.) cultivars grown in Turkey*”; *Food Chemistry* - 80(3): 564-570

- Heredia, Norma; Wesley, Irene; García, Santos; (2009) *"Microbiologically safe foods"*; 1ª Edição, John Wiley & Sons, New Jersey
- Herrera, M.C.; Castro, M.D. Luque de; (2005) *"Ultrasound-assisted extraction of phenolic compounds from strawberries prior to liquid chromatographic separation and photodiode array ultraviolet detection"*; Journal of Chromatography A - 1100: 1-7
- Hill, Colin; (2012) *"Virulence or niche factors: What's in a name?"*; Journal of Bacteriology - 194(21): 5725-5727
- Holmes, Alison H.; Moore, Luke S.P.; Sundsfjord, Arnfinn; Steinbakk, Martin; Regmi, Sadie; Karkey, Abhilasha; Guerin, Philippe J.; Piddock, Laura J.V.; (2016) *"Understanding the mechanisms and drivers of antimicrobial resistance"*; Lancet - 387:176 - 187
- Hossain, Md. Akil; Lee, Seung-Jin; Park, Ji-Yong; Reza, Md. Ahsanur; Kim, Tae-Hwan; Lee, Ki-Ja; Suh, Joo-Won; Park, Seung-Chun; (2015) *"Modulation of quorum sensing-controlled virulence factors by Nymphaea tetragona (water lily) extract"*; Journal of Ethnopharmacology - 174: 482-491
- Hosseinian, Frah S.; Li, Wende; Beta, Trust; (2008) *"Measurement of anthocyanins and other phytochemicals in purple wheat"*; Food Chemistry - 109: 916-924
- Husain, Fohad M.; Ahmad, Iqbal; Alshabib, Nasser A.; (2015) *"Sub-MICs of Mentha piperita essential oil and menthol inhibits AHL mediated quorum sensing and biofilm of Gram-negative bacteria"*; Frontiers in Microbiology - 6:420-434
- Huynh, Duyen Thi Ngoc; Kim, Ah-Young; Seol, In-Hye; Jung, Samuel; Lim, Min-Cheol; Lee, Jeong-A; Jo, Mi-Rae; Choi, Soo-Jin; Kim, Borim; Lee, Jinwon; Kim, Wooki; Kim, Young-Rok; (2015) *"Inactivation of the virulence factors from 2,3-butanediol-producing Klebsiella pneumoniae"*; Biotechnological Products and Process Engineering - 99: 9427-9438
- INE (Instituto Nacional de Estatística) - Estatística do consumo de frutos em Portugal; 2013-2014
- Kalia, Manmohit; Yadav, Vivek Kumar; Singh, Pradeep Kumar; Sharma, Deepmala; Pandey, Himanshu; Narvi, Shahid Suhail; Agarwal, Vishnu; (2015) *"Effect of Cinnamon Oil on quorum sensing-controlled virulence factors and biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa"* PLOS one - 10(8): 1-18
- Kazemian, Hossein; Ghafourian, Sobhan; Heidari, Hamid; Amiri, Pouya; Yamchi, Jalil Kardan; Shavalipour, Aref; Hourri, Hamidreza; Maleki, Abbas; Sadeghifard, Nourkhoda; (2015) *"Antibacterial, anti-swarming and anti-biofilm formation activities of Chamaemelum nobile against Pseudomonas aeruginosa"*; 48(4): 432-436

Kearns, Daniel B.; (2011) "A field guide to bacterial swarming motility"; *Nature Reviews Microbiology* - 8(9): 634-644

Kelebek, Hasim; Selli, Serkan; (2011) "Evaluation of chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars"; *International Journal of Food Science and Technology* - 46: 2530-2537

Kim, Han-Shin; Park, Hee-Deung; (2013) "Ginger extract inhibits biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14"; *PLoS One* - 8(9):1-29

Lee, Jungmin; (2005) "Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants and wines by the pH differential method: collaborative study"; *Journal of AOAC International* - 88(5): 1269 - 1278

Levy, Stuart B.; Marshall, Bonnie; (2004) "Antibacterial resistance worldwide: causes, challenges and responses"; *Nature* - 10(12): 122-129

Lomovskaya, O.; Watkins, W.; (2001) "Inhibition of efflux pumps as a novel approach to combat drug resistance in bacteria"; *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology* - 3(2): 225-236

Luís, Ângelo; Duarte, Andreia; Gominho, Jorge; Domingues, Fernanda; Duarte, Ana Paula; (2016) "Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils"; *Industrial Crops and Products* - 79: 274-282

Luís, Ângelo; Gil, Nuno; Amaral, Maria Emília; Domingues, Fernanda; Duarte, Ana Paula; (2012) "Ailanthus Altissima (Miller) Swingle: A source of bioactive compounds with antioxidant activity"; *Bioresources*- 7(2): 2105-2120

Mabhiza, Donald; Chitemerere, Tariro; Mukanganyama, Stanley; (2015) "Antibacterial properties of alkaloid extracts from *Callistemon citrinus* and *Vernonia adoensis* against *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*"; *International Journal of Medicinal Chemistry* - 2016: 1-7

Mehndiratta, P.L.; Bhalla, P.; (2013) "Use of antibiotics in animal agriculture & emergence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) clones: Need to assess the impact on public health"; *Indian Journal of Medical Research* - 140: 339-344

McCune, Letitia M.; Kubota, Chieri; Stendell-Hollis, Nicole R.; Thomson, Cynthia A.; (2011) "Cherry and Health: a review"; *Food Science and Nutrition* - 51(1):1-12

Musthafa, Khadar Syed e Voravuthikunchai, Supayang Piyawan; (2015) "Anti-virulence potential of eugenyl acetate against pathogenic bacteria of medical importance"; *Antonie van Leeuwenhoek* - 107(3): 703-710

Nohynek, Liisa J.; Alakomi, Hanna-Leena; Kähkönen, Marja P.; Heinonen, Marina; Helander, Ilkka M.; Oksman-Caldentey, Kirsi-Marja; Puupponen-Pimiä, Riitta H.; (2006) "*Berry Phenolics: Antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens*"; Nutrition and Cancer - 54(1): 18-32

Noumedem, Jaurès AK; Mihasan, Marius; Kuate, Jules R.; Stefan, Marius; Cojocaru, Dumitru; Dzoyem, Jean P.; Kuete, Viector; (2013) "*In vitro antibacterial and antibiotic-potential activities of four edible plants against multidrug-resistant gram-negative species*"; BMC Complementary & Alternative Medicine - 13: 190-207

O'May, Che; Tufenkji, Nathalie; (2011) "*The Swarming motility of Pseudomonas aeruginosa is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials*"; Applied and Environmental Microbiology - 77(9): 3061-3067

O'Toole, George; Kaplan, Heidi B.; Kolter, Robert; (2000) "*Biofilm formation as microbial development*"; Annual Reviews in Microbiology - 54: 49-79

Oancea, Simona; Grosu, Cristian; Ketney, Otto; Stoia, Mihaela; (2013) "*Conventional and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from blackberry and sweet cherry cultivars*"; Acta Chimica Slovenica- 60(2): 383-389

Partridge, Jonathan D.; Harshey, Rasika M.; (2012) "*Swarming: flexible roaming plans*"; Journal of Bacteriology - 195(5): 909-918

Pekal, Anna; Pyrzynska, Krystyna; (2014) "*Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content assay*"; Food Analytical Methods - 7: 1776-1782

Petkovic, Bosko; Matos, Snjezana; Gorgi, Nebojsa; Kukric, Zoran; (2014) "*Analysis of antioxidant activity of different species of wild cherry (Prunus avium L.)*"; Journal of Agriculture Science - 3(5): 128-135

Poontawee, Warut; Natakankitkul, Surapol; Wongmekiat, Orawan; (2015) "*Enhancing phenolic contents and antioxidant potentials of Antidesma thwaitesianum by supercritical carbon dioxide extraction*"; Journal of Analytical Methods in Chemistry - 2015: 1-7

Puupponen-Pimiä, R.; Nohynek, L.; Meier, C.; Kähkönen, M.; Heinonen, M.; Hopia, A.; Oksman-Caldentey, K.M.; (2001) "*Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries*"; Journal of Applied Microbiology - 90: 494-507

Routray, Winny; Orsat, Valerie; (2014) "*MAE of phenolic compounds from blueberry leaves and comparison with other extraction methods*"; Industrial Crops and Products - 58: 36-45

Serra, Ana Teresa; Duarte, Rui O.; Bronze, Maria R.; Duarte, Catarina M. M.; (2011) "*Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal*"; Food Chemistry- 125: 318-325

- Serra, Ana Teresa; Seabra, Inês J.; Braga, Mara E.M.; Bronze, M.R.; Sousa, Hermínio C. de; Duarte, Catarina M. M.; (2010) “*Processing cherries (Prunus avium) using supercritical fluid technology. Part 1: Recovery of extract fractions rich in bioactive compounds*”; The Journal of Supercritical Fluids - 55: 184-191
- Singh, Brahma N.; Singh, H.B.; Singh, Akanksha; Singh, Braj R.; Mishra, Aradhana; Nautiyal, C.S.; (2012) “*Lagerstroemia speciosa fruit extract modulates quorum sensing-controlled virulence factor production and biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa*”; Microbiology - 158: 529-538
- Souza, Vanessa Rios de; Pereira, Patrícia Aparecida Pimenta; Silva, Thais Lomônaco Teodoro da; Lima, Luiz Carlos de Oliveira; Pio, Rafael; Queiroz, Fabiana; (2014) “*Determination of bioactive compounds, antioxidante activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits*”; Food Chemistry - 156: 362-368
- Souza, Gabriel L.C. de; Oliveira, Leonardo M. F. de; Vicari, Rafael G.; Brown, Alex; (2016) “*A DFT investigation on the structural and antioxidante properties of new isolated interglycosidic O-(1→3) linkage flavonols*”; Journal of Molecular Modeling - 22: 100-109
- Szabo, M.R.; Iditoiu, C.; Chambre, D.; Lupea, A.X.; (2007) “*Improved DPPH determination for antioxidante activity spectrophotometric assay*”; Chemical Papers - 61(3): 214-216
- Teledyne ISCO, Chromatography Application Note AN87, “*RediSep® Rf Strong Anion Exchange Column Applications*”; 2012
- Teixeira, José; Gaspar, Alexandra; Garrido, E. Manuela; Garrido, Jorge; Borges, Fernanda; (2013) “*Hydroxycinnamic acid antioxidants: and electrochemical overview*”; BioMed Reasearch International - 2013:1-11 pages
- Teixeira, Luciana Nascimento; Stringheta, Paulo César; Oliveira, Fabiana Alves de; (2008) “*Comparação de métodos para quantificação de antocianinas*”; Ceres - 55(4): 297-304
- Ulrey, Robert K.; Barksdale, Stephanie M.; Zhou, Weidong; Hoek, Monique L. van; (2014) “*Cranberry Proanthocyanidins have anti-biofilm properties against Pseudomonas aeruginosa*”; Complementary & Alternative Medicine - 14: 499-523
- Vattem, D. A.; Mihalik, K.; Crixell, S.H.; McLean, R.J.C.; (2007) “*Dietary phytochemicals as quórum sensing inhibitors*”; Fitoterapia - 78: 302-310
- Venter, Henrietta; Mowla, Rumana; Ohene-Agyei, Thelma; Ma, Shutao; (2015) “*RNA-type drug efflux pumps from Gram-negative bacteria: molecular mechanism and inhibition*”; Frontiers in Microbiology - 6:337-406

Wang, Shuang-Ying; Sun, Zhong-Lin; Liu, Tao; Gibbons, Simon; Zhang, Wen-Ju; Qing, Um; (2013) "*Flavonoids from Sophora moorcroftiana and their synergistic antibacterial effects on MRSA*"; *Phytotherapy Research* - 28:1071-1076

Worthington, Roberta J.; Richards, Justin J.; Melander, Christian; (2012) "*Small molecule control of bacterial biofilms*"; *Organic & Biomolecular Chemistry* - 10: 7457-7474

Zhang, Weiwei; Li, Chenghua; (2016) "*Exploiting quorum sensing interfering strategies in gram-negative bacteria for the enhancement of environmental applications*"; *Frontiers of Microbiology* - 6: 1535-1578

Zheng, Xianzhe; Xu, Xiangwen; Liu, Chenghai; Lin, Zhen; Liu, Haijun; (2012) "*Extraction characteristics and optimal parameters of anthocyanin from blueberry powder under microwave-assisted extraction conditions*"; *Separation and Purification Technology* - 104:17-25

Zwir-Ferenc, A.; Biziuk, M.; (2006) "*Solid phase extraction technique - trends, opportunities and applications*"; *Polish Journal of Environmental Studies* - 15(5): 677-690

# 7. Anexos

## 7.1. Purificação

No ponto 4.2 (Purificação) do capítulo 4 (Resultados), é exemplificado apenas um cromatograma de uma variedade de cereja, Saco Colheita Tardia. De seguida serão apresentados os restantes cromatogramas para as outras variedades.

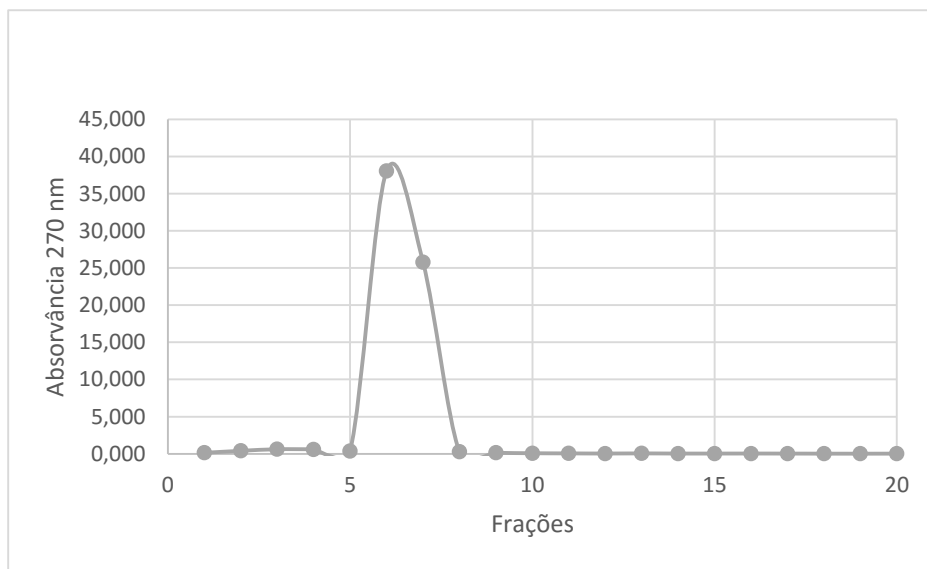


Figura 37 - Comatograma da purificação do extrato de cereja Sweetheart - 500mg em água acidificada em pH=2,5

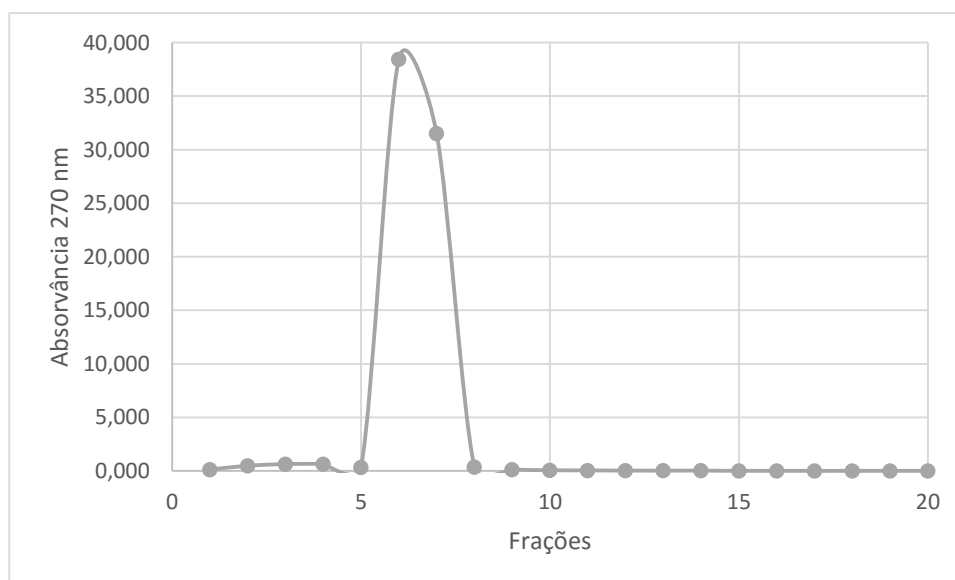


Figura 38 - Cromatograma da pruficação do extrato de cereja Brooks - 500 mg em água acidificada em pH=2,5

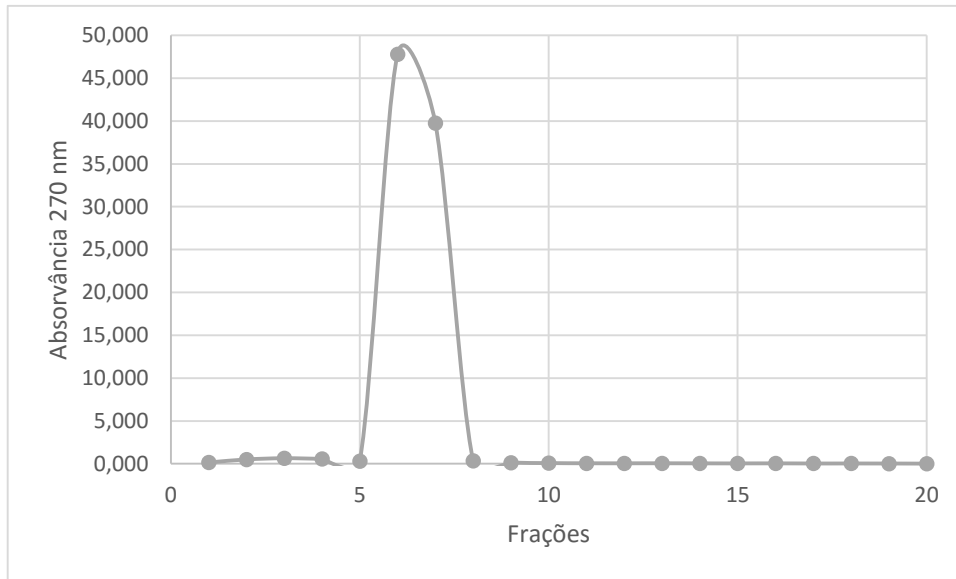


Figura 39 - Cromatograma da purificação do extrato de cereja Summit - 500 mg em água acidificada pH=2,5

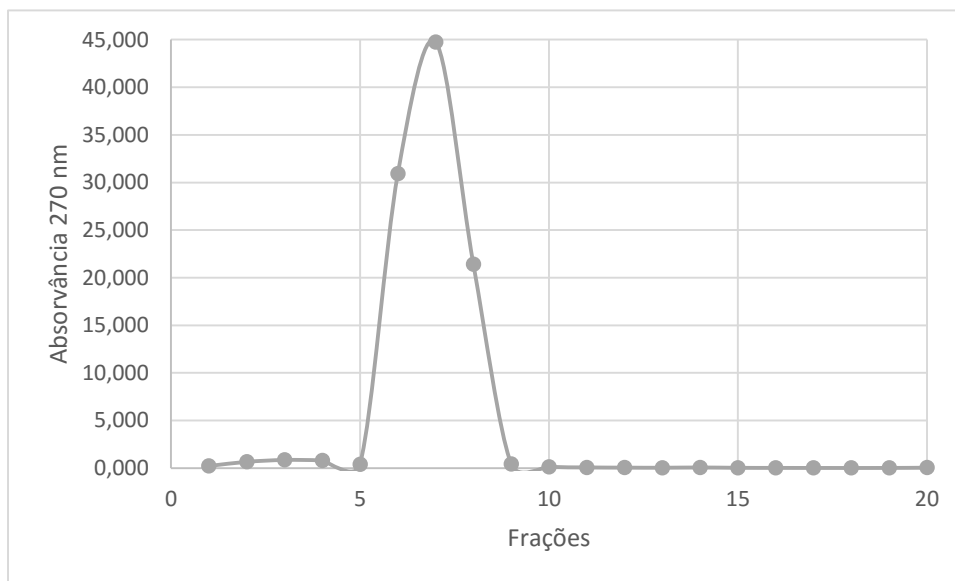


Figura 40 - Cromatograma da purificação do extrato de cereja Primulat - 500 mg em água acidificada pH=2,5

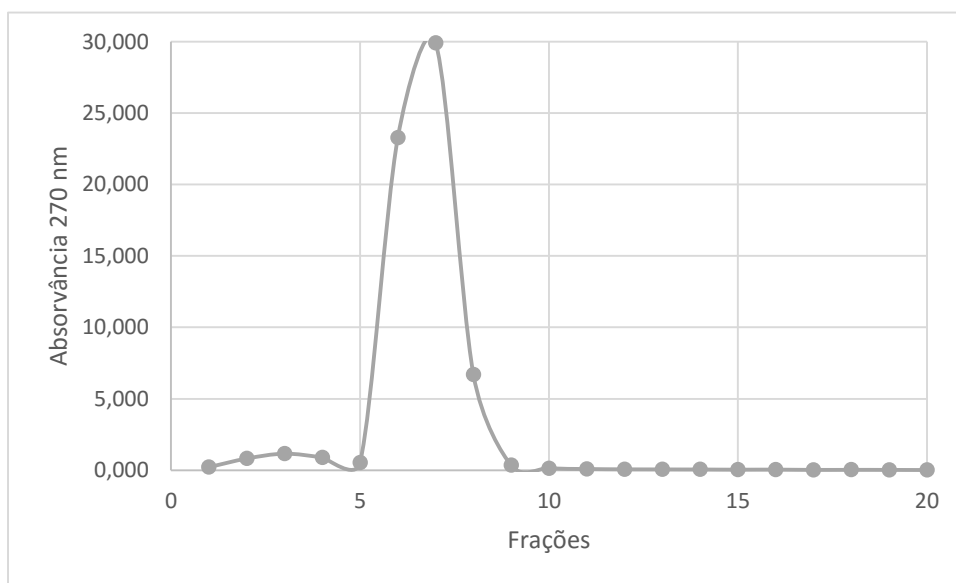


Figura 41 - Cromatograma da purificação do extrato de cereja Earlise - 500 mg em água acidificada em pH=2,5

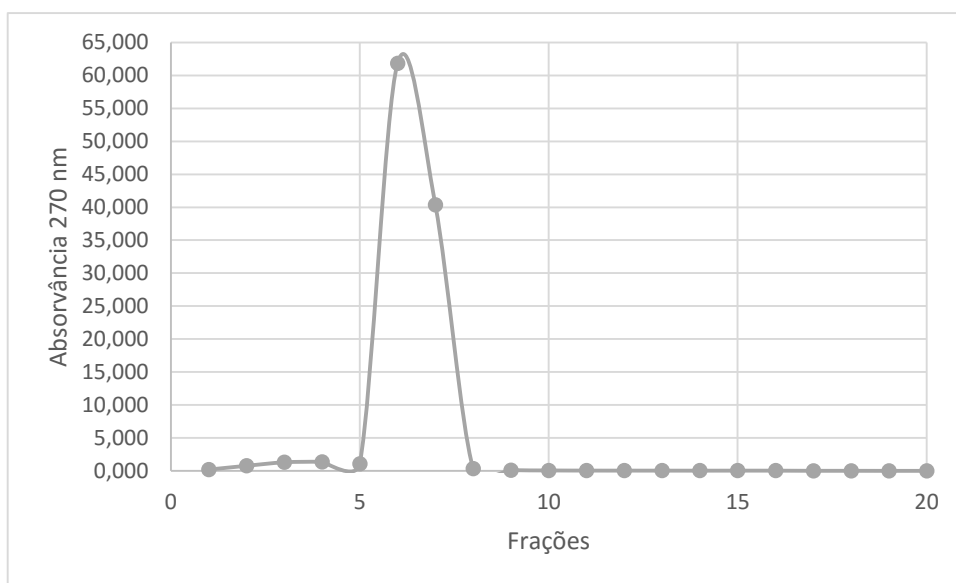


Figura 42 - Cromatograma da purificação do extrato de cereja Saco - 500 mg em água acidificada em pH= 2,5

## 7.2. Atividade antioxidante

No ponto 4.4.1 (atividade antioxidante) do capítulo 4 (resultados), é exemplificada a determinação da actividade antioxidante da variedade de cereja Saco Colheita Tardia. De seguida serão apresentados os restantes cálculos e gráficos necessários para a determinação da atividade antioxidante das outras variedades de cereja.

### 7.2.1. Padrões

#### 7.2.1.1. Trolox

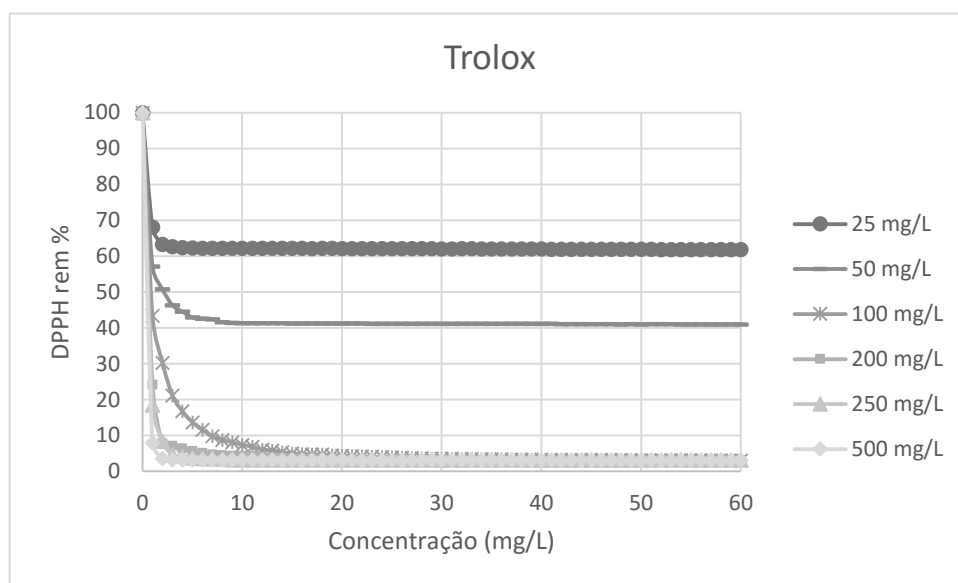


Figura 43 - Comportamento cinético do DPPH na presença do padrão antioxidante trolox

Para t=60 min, obtém-se a figura 44:

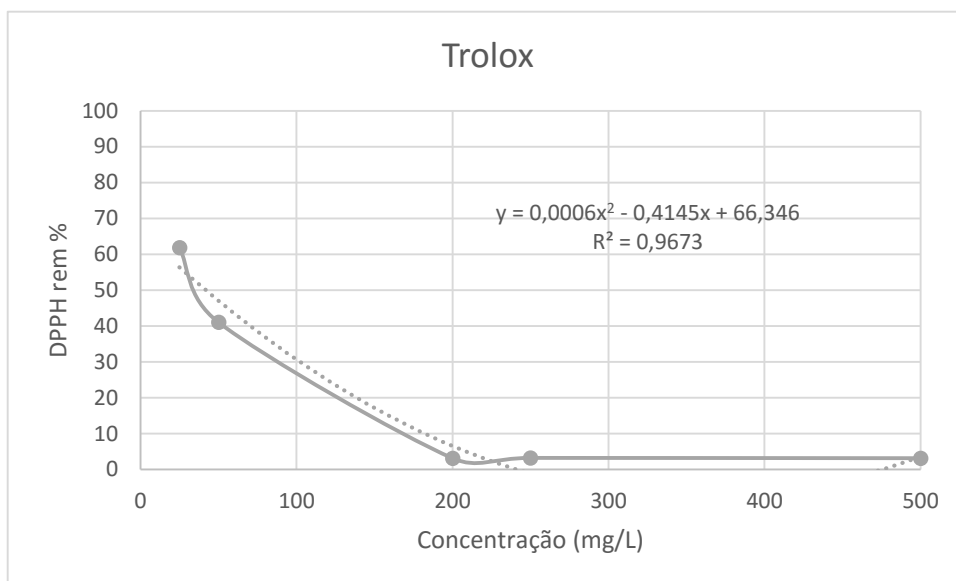


Figura 44 - Percentagem de DPPH remanescente em função da concentração do padrão antioxidante trolox

Assim, para  $\%DPPH_{rem}=50$ , calcula-se o EC50 a partir da equação da curva da figura 44. Assim sendo, obtém-se um EC50 para o padrão antioxidante trolox de 41,99 de mg/L, o que significa, que esta é a concentração necessária para diminuir em 50% a concentração de DPPH.

### 7.2.1.2. Quercetina

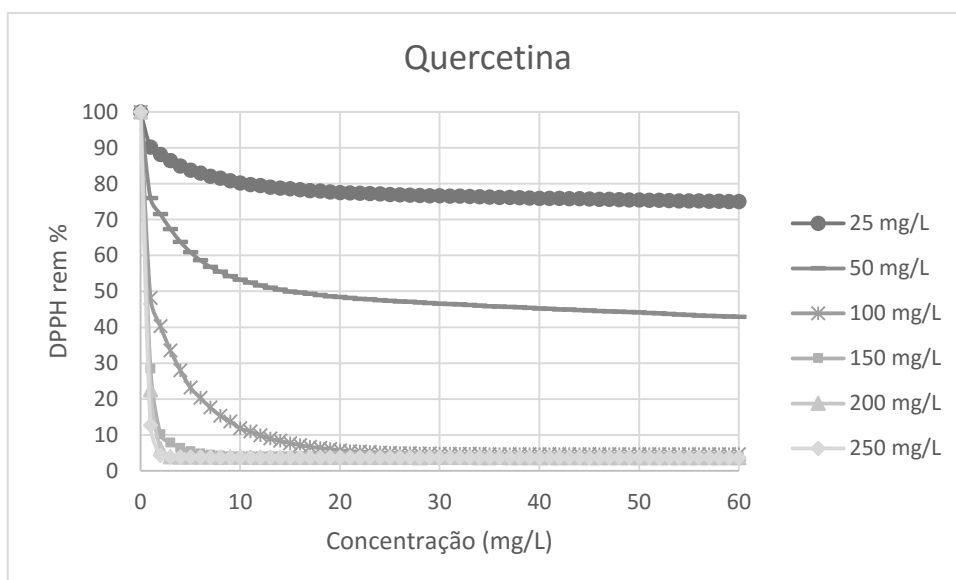


Figura 45 - Comportamento cinético do DPPH na presença do padrão quercetina

Para  $t=60$  min, obtém-se a figura 46:

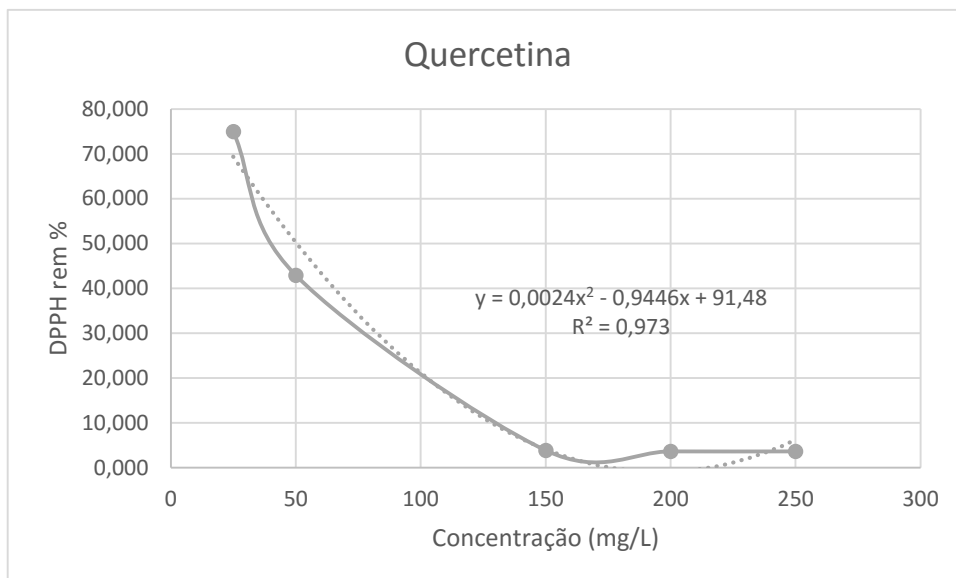


Figura 46 - Percentagem de DPPH remanescente em função da concentração do padrão quercetina

Assim, para  $\%DPPH_{rem}=50$ , calcula-se o EC50 a partir da equação da curva da figura 46. Assim sendo, obtém-se um EC50 para o padrão antioxidante quercetina de 50,36 mg/L, o que significa, que esta é a concentração necessária para diminuir em 50% a concentração de DPPH.

### 7.2.2. Sweetheart

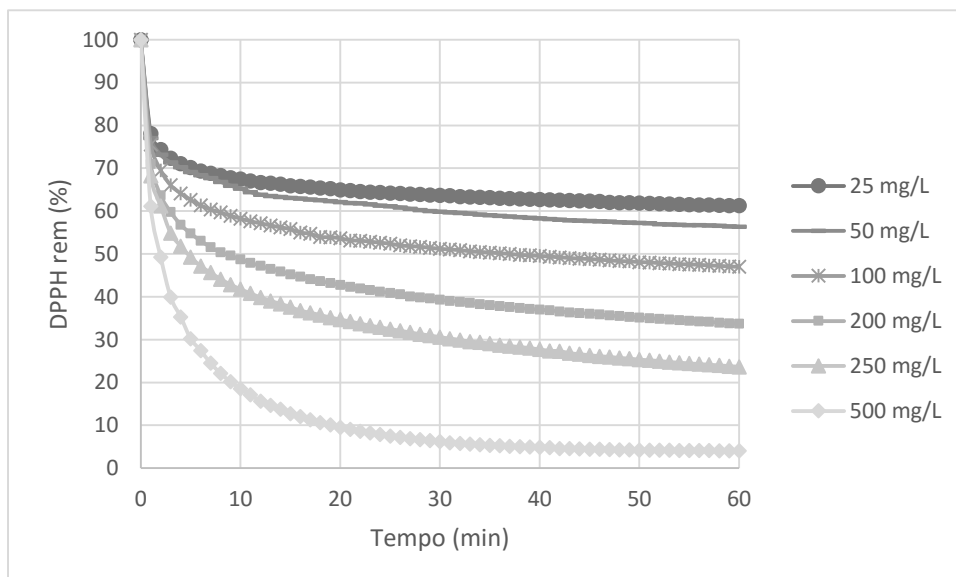


Figura 47 - Comportamento cinético do DPPH em função do tempo para o extrato purificado da variedade de cereja Sweetheart

Para  $t=60$  min, obtém-se o figura 48:

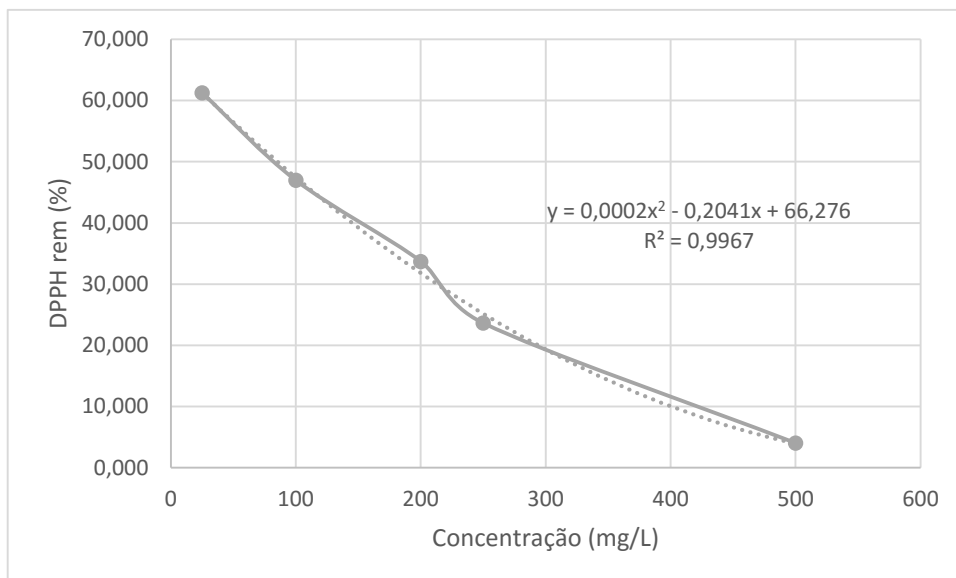


Figura 48 - Percentagem de DPPH remanescente em função da concentração de extrato purificado de Sweetheart

Assim, para  $\%DPPH_{rem}=50$ , calcula-se o EC50 a partir da equação da curva da figura 48. Assim sendo, obtém-se um EC50 para a variedade de cereja Sweetheart de 87,20 mg/L, o que significa que esta é a concentração necessária para diminuir em 50% a concentração de DPPH.

### 7.2.3. Earlise

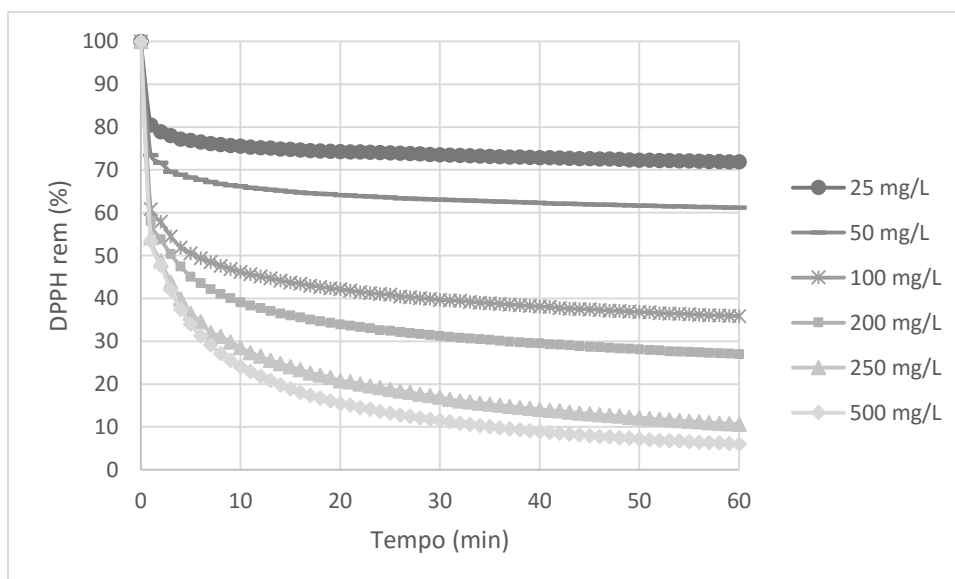


Figura 49 - Comportamento cinético do DPPH em função do tempo para o extrato purificado da variedade de cereja Earlise

Para  $t=60$  min, obtém-se a figura 50:

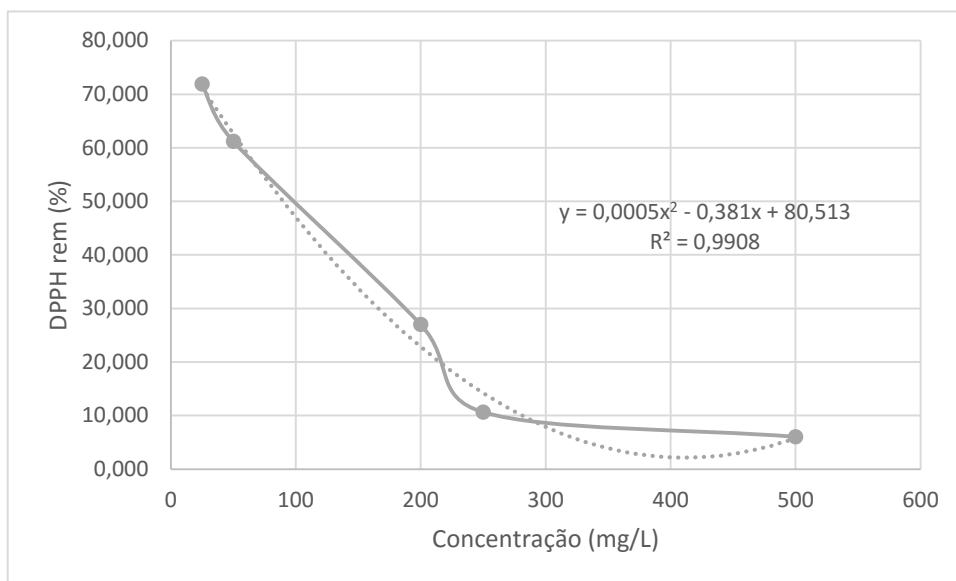


Figura 50 - Percentagem de DPPH remanescente em função da concentração de extrato purificado de Earlise

Assim, para  $\%DPPH_{rem}=50$ , calcula-se o EC50 a partir da equação da curva da figura 50. Assim sendo, obtém-se um EC50 para a variedade de cereja Earlise de 90,94 mg/L, o que significa que esta é a concentração necessária para diminuir em 50% a concentração de DPPH.

#### 7.2.4. Summit

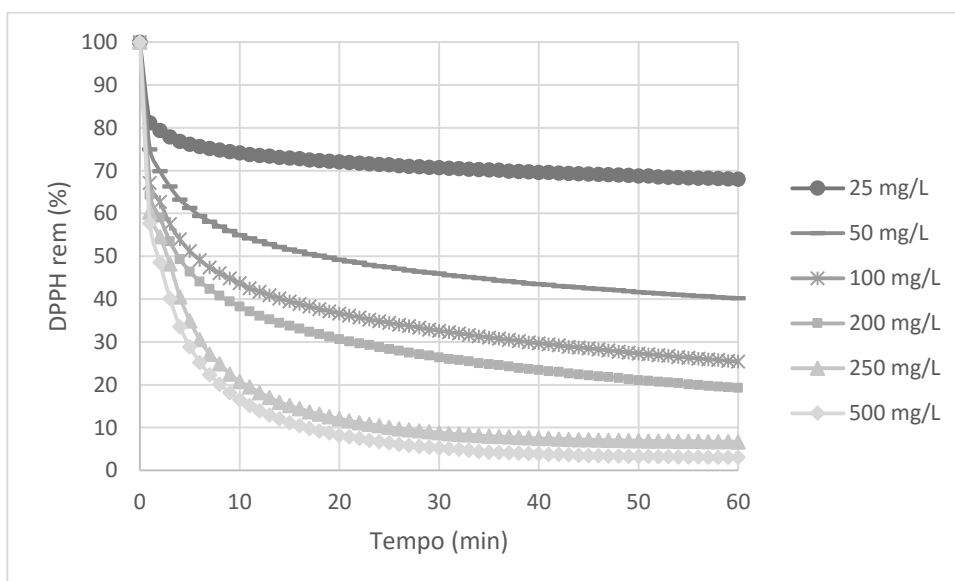


Figura 51 - Comportamento cinético do DPPH em função do tempo para o extrato purificado da variedade de cereja Summit

Para t=60 min, obtém-se a figura 52:

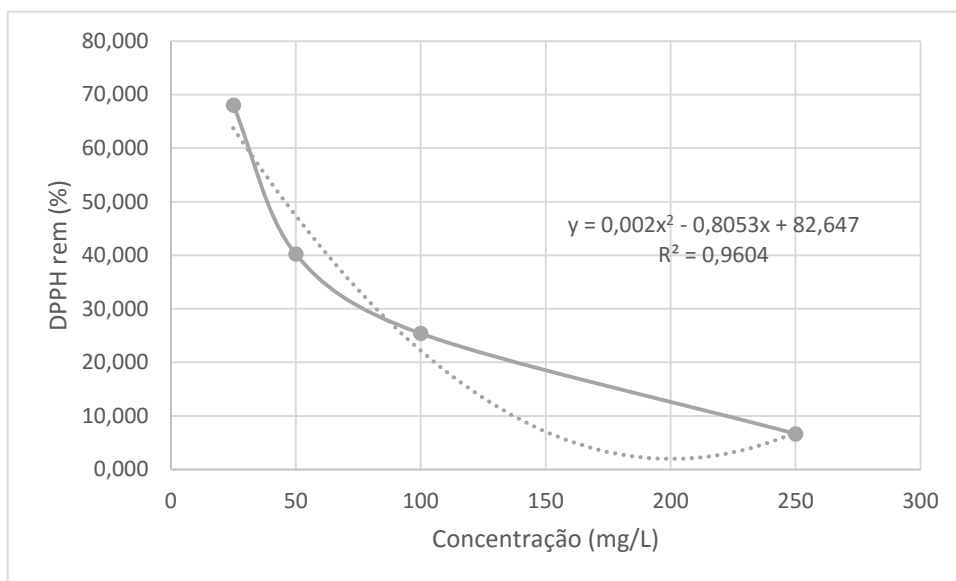


Figura 52 - Percentagem de DPPH remanescente em função da concentração de extrato purificado de Summit

Assim, para  $\%DPPH_{rem}=50$ , calcula-se o EC50 a partir da equação da curva da figura 52. Assim sendo, obtém-se um EC50 para a variedade de cereja Sweetheart de 45,74 mg/L, o que significa que esta é a concentração necessária para diminuir em 50% a concentração de DPPH.

### 7.2.5. Brooks

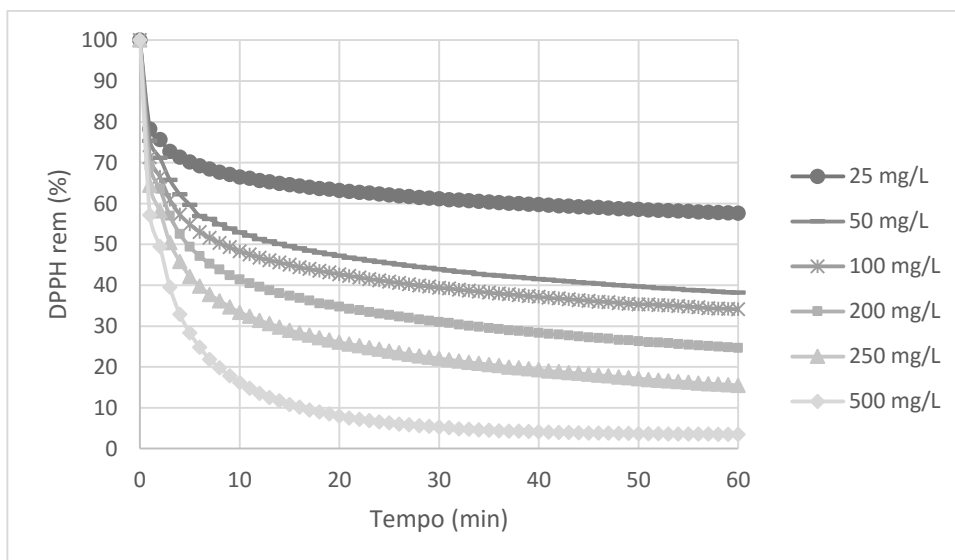


Figura 53 - Comportamento cinético do DPPH em função do tempo para o extrato purificado da variedade de cereja Brooks

Para t=60 min, obtém-se a figura 54:

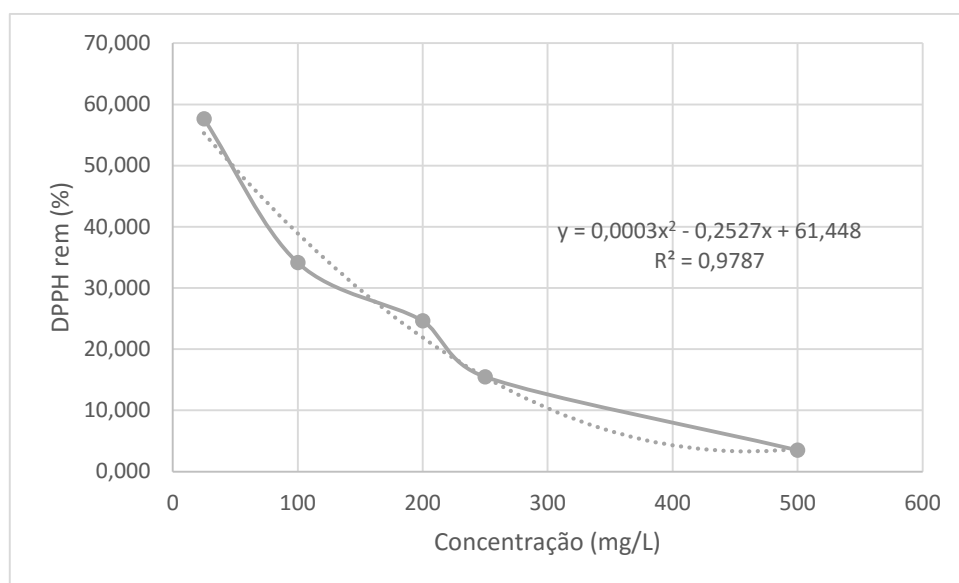


Figura 54 - Percentagem de DPPH remanescente em função da concentração de extrato purificado de cereja Brooks

Assim, para  $\%DPPH_{rem}=50$ , calcula-se o EC50 a partir da equação da curva da figura 54. Assim sendo, obtém-se um EC50 para a variedade de cereja Brooks de 48,04 mg/L, o que significa que esta é a concentração necessária para diminuir em 50% a concentração de DPPH.

### 7.2.6. Saco 1ª Colheita

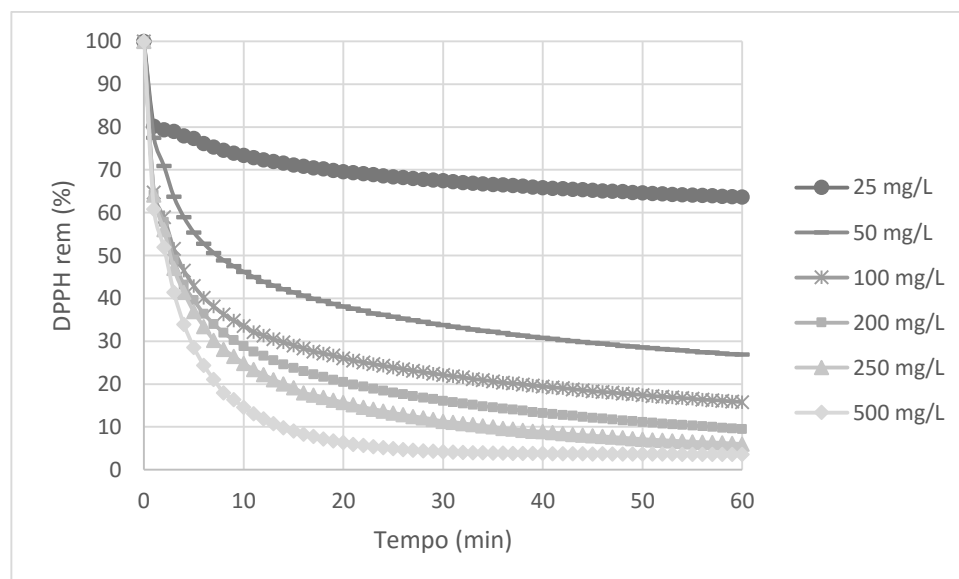


Figura 55 - Comportamento cinético do DPPH em função do tempo para o extrato purificado da variedade de cereja Saco 1ª Colheita

Para t=60 min, obtém-se a figura 56:

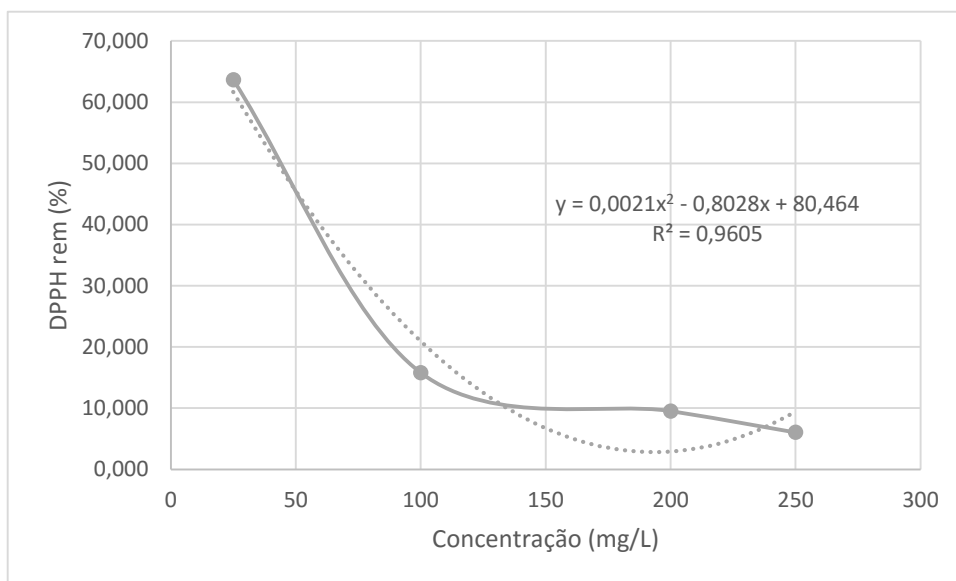


Figura 56 - Percentagem de DPPH remanescente em função da concentração de extrato purificado de Saco 1ª Colheita

Assim, para  $\%DPPH_{rem}=50$ , calcula-se o EC50 a partir da equação da curva da figura 56. Assim sendo, obtém-se um EC50 para a variedade de cereja Saco 1ª Colheita de 42,72 mg/L, o que significa que esta é a concentração necessária para diminuir em 50% a concentração de DPPH.

### 7.2.7. Primulat

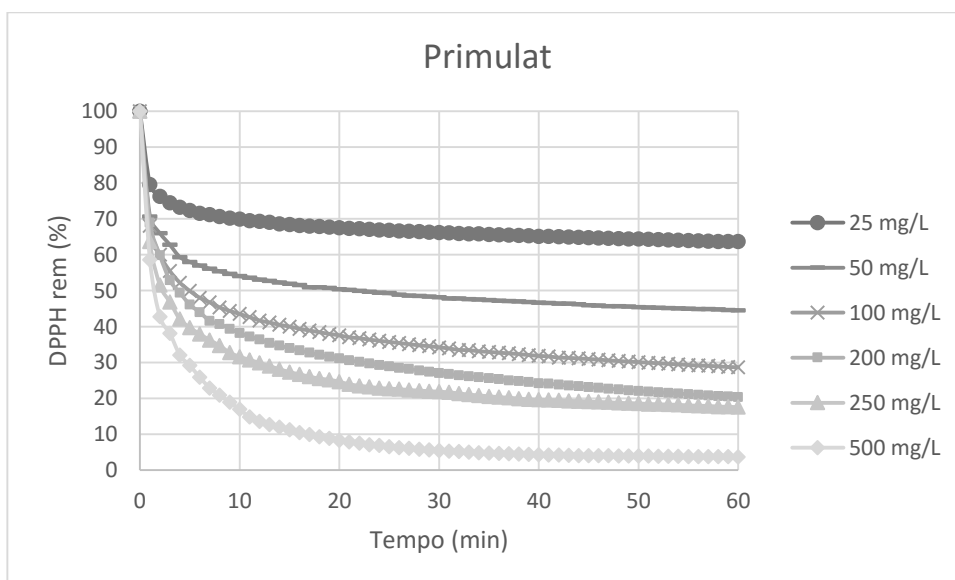


Figura 57 - Comportamento cinético do DPPH em função do tempo para o extrato purificado da variedade de cereja Primulat

Para t=60 min, obtém-se a figura 58:

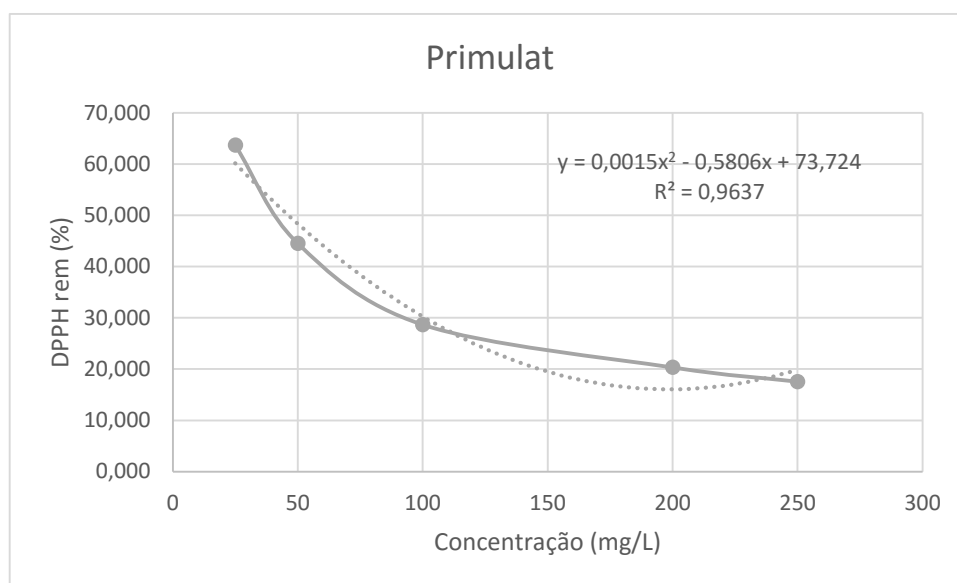


Figura 58 - Percentagem de DPPH remanescente em função da concentração de extrato purificado de Primulat

Assim, para  $\%DPPH_{rem}=50$ , calcula-se o EC50 a partir da equação da curva da figura 58. Assim sendo, obtém-se um EC50 para a variedade de cereja Primulat de 46,43 mg/L, o que significa que esta é a concentração necessária para diminuir em 50% a concentração de DPPH.