



**Propriedades nutricionais e medicinais de frutos e pedúnculos de
Prunus avium L. (Cerejeira).**

Claudete António André Bastos

Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção
do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar

Orientado por

Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira

Lillian Bouçada de Barros

Bragança

2014

Agradecimentos

Agradeço a **Deus**, pelo dom de vida e sabedoria, pois, com a sua imensa Graça sempre me conduziu na direção certa. Assim, com a minha alma alegre e satisfeita, declaro a minha profunda gratidão e reconhecimento à Professora Doutora **Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira** e à Doutora **Lillian Bouçada de Barros** pelo carinho, dedicação, perfeição, excelência e pela especial atenção na transmissão dos ensinamentos necessários para a realização deste trabalho.

Ao Professor Doutor **Carlos Aguiar**, agradeço a colaboração na identificação botânica da espécie estudada e ao Doutor **Ricardo C. Calhela**, a amizade, força, dedicação e colaboração nos ensaios de avaliação da atividade antitumoral. Agradeço ainda à equipa do Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada- BioChemCore, da Escola Superior Agrária de Bragança, nomeadamente aos doutorandos **Ângela Fernandes, Carla Pereira, Eliana Pereira, Maria Inês Dias, Márcio Carocho, Sandrina Heleno**, e ao Doutor **João C.M. Barreira**, pela amizade, simpatia e ajuda na realização dos ensaios laboratoriais.

Aos Professores Doutores **Manuel Octávio Spínola** e **Albino Bento**, agradeço a sua disponibilidade e por terem feito tudo para tornar um sonho numa realidade. Em especial, agradeço ao Governo Angolano, por conceder e financiar a minha bolsa de estudos, à Direcção Geral da Maternidade Provincial do Cuanza Sul, pela dispensa concedida, assim como, ao Instituto Superior Politécnico do Cuanza Sul e Instituto Politécnico de Bragança.

À minha **família**, que sempre me apoiou e, especialmente, aos meus irmãos **Nelson Bastos, Julieta Quessongo, Augusto Canganjo, Mário Bastos, Ângela Bastos**, e à minha mãe **Marta António** que sempre se empenhou na minha educação e à qual dedico esta etapa. Não esquecendo, os meus **colegas** e **amigos**, especialmente **Zelda, Bela, Elizangela, Dadiel Santos, Alcino João, Acácio Gongá, Osvaldo Lopes**, pelo carinho, motivação e, acima de tudo, pela irmandade. Agradeço à irmã **Carlota** e aos pastores, **Jussara** e **Van César**, pelo encorajamento, carinho e hospitalidade.

A todos quanto contribuíram para o sucesso de mais uma conquista.

Muito obrigada!

Pensamento

*O caminho de Deus é perfeito;
a palavra do Senhor é provada;
é um escudo para todos os que nele confiam.*

Salmo 18:30.

Índice Geral

Agradecimentos	3
Índice de figuras	9
Índice de tabelas	11
Lista de abreviaturas	13
Resumo	17
Abstract	19
1. Introdução	21
1.1. <i>Prunus avium</i> L.	21
1.2. Propriedades nutricionais de <i>Prunus avium</i> L.	23
1.3. Compostos fenólicos em <i>Prunus avium</i> L.	27
1.4. Atividade antioxidante de <i>Prunus avium</i> L.	30
1.5. Atividade antitumoral de <i>Prunus avium</i> L.	34
2. Objetivos	37
3. Material e Métodos	39
3.1. Padrões e Reagentes	39
3.2. Material vegetal	39
3.3. Caracterização química de <i>Prunus avium</i> L.	40
3.3.1. <i>Macronutrientes e valor energético</i>	40
3.3.2. <i>Compostos hidrofílicos</i>	40
3.3.3. <i>Compostos lipofílicos</i>	41
3.4. Preparação de extratos para avaliação da bioatividade e análise de compostos fenólicos	42
3.5. Avaliação da atividade antioxidante	43
3.5.1. <i>Atividade captadora de radicais DPPH</i>	43
3.5.2. <i>Poder redutor</i>	44
3.5.3. <i>Inibição da descoloração do β-caroteno</i>	44
3.5.4. <i>Inibição da peroxidação lipídica através do ensaio das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)</i>	45
3.6. Avaliação do potencial antitumoral e citotoxicidade	45
3.6.1. <i>Atividade antiproliferativa em linhas celulares tumorais humanas</i>	45
3.6.2. <i>Hepatotoxicidade em células não tumorais</i>	46

3.7. Análise de compostos fenólicos	47
3.7.1. Ácidos fenólicos e flavonoides	47
3.7.2. Antocianinas.....	48
3.8. Análise estatística.....	49
4. Resultados e Discussão.....	51
4.1. Caracterização química de frutos e pedúnculos de <i>P. avium</i>	51
4.1.1. Macronutrientes e compostos hidrofílicos	51
4.1.2. Compostos lipofílicos	52
4.2. Bioatividade de diferentes preparações de frutos e pedúnculos de <i>P. avium</i>	54
4.2.1. Atividade antioxidante	54
4.2.2. Atividade antitumoral e hepatotoxicidade	56
4.3. Análise de compostos fenólicos	56
4.3.1. Ácidos fenólicos	61
4.3.2. Flavonoides	61
4.3.3. Antocianinas.....	63
5. Conclusões.....	65
Referências bibliográficas	67
Anexos	79

Índice de figuras

Figura 1. Árvore (A); frutos e pedúnculos (B) de <i>Prunus avium</i> L.	21
Figura 2. Exemplos de vitaminas lipossolúveis- vitamina E (A) e hidrossolúveis- vitamina C (B).....	25
Figura 3. Estrutura química dos diferentes ácidos cafeoilquínico e <i>p</i> - cumaroilquínico.....	28
Figura 4. Estrutura química da quercetina	28
Figura 5. Estrutura química da cianidina 3- <i>O</i> -rutinósido (A) e da cianidina 3- <i>O</i> - glucósido (B).....	29
Figura 6. Perfis de compostos fenólicos no extrato metanol/água de pedúnculos de <i>P. avium</i> (registado a 280 nm) (A); extrato metanol/água de frutos de <i>P. avium</i> (registado a 370 nm) (B).	57
Figura 7. Perfil de antocianinas no extrato metanol/água dos frutos de <i>P. avium</i> (registado a 520 nm).....	64

Índice de tabelas

Tabela 1. Caracterização de frutos de <i>P. avium</i> em macronutrientes, e de frutos e pedúnculos em compostos hidrofílico.....	51
Tabela 2. Caracterização de pedúnculos e frutos de <i>P. avium</i> em compostos lipofílicos.....	53
Tabela 3. Propriedades bioativas de diferentes preparações obtidas a partir de pedúnculos e frutos de <i>P. avium</i>	55
Tabela 4. Tempos de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorvância máxima na região do visível (λ_{max}), informação dos espectros de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos em pedúnculos de <i>P. avium</i>	58
Tabela 5. Tempos de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorvância máxima na região do visível (λ_{max}), informação dos espectros de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos em extratos metanol/água dos frutos de <i>P. avium</i>	60

Lista de abreviaturas

Abs	Absorvância
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANOVA	Análise de variância
AOAC	Associação Oficial de Químicos Analíticos
ACR	Atividade captadora de radicais
BHT	Butil-hidroxitolueno (2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol)
CAT	Catalase
CE	Energia de colisão
CES	Espalhamento da energia de colisão
DAD	Detetor de díodos
DMEM	Meio de cultura para células animais (<i>Dulbecco Modified Eagle</i>)
DP	Potencial de não-cluster
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
EC₅₀	Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor
<i>e.g</i>	Por exemplo
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EP	Potencial de entrada
EPI	Ião produto
ESI	Fonte de ionização Electrospray
EUA	Estados Unidos da América
FA	Ácidos gordos
FAME	Ésteres metílicos de ácidos gordos
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
FID	Detetor de ionização de chama
Fw	Massa fresca
GC	Cromatografia gasosa
GI₅₀	Concentração da amostra responsável por 50% de inibição do crescimento celular
GS•	Radical glutationa
GPH-Px	Glutationa peroxidase

GSH-R	Glutationa redutase
GSH	Glutationa
GS-SG	Glutationa dissulfito
GSH-T	Glutationa transferase
GSNO	S-nitrosoglutationa
HBSS	Solução salina de Hank's
HCT-15	Linha celular humana de carcinoma do cólon
HeLa	Linha celular humana de carcinoma cervical
HepG2	Linha celular humana de carcinoma hepatocelular
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOH	Álcool lipídico
LOO•	Radical peróxido lipídico
MCF-7	Linha celular humana de adenocarcinoma mamário
MS	Espectrometria de massa
MUFA	Ácidos gordos monoinsaturados
m/z	Razão carga-massa
NCI-H460	Linha celular humana de carcinoma de pulmão
n°	Número
Nd	Não detetado
PI	Padrão interno
PLP2	Cultura de células primárias de fígado de porco
PUFA	Ácidos gordos polinsaturados
RI	Índice de refração
RNS	Espécies reativas de azoto
ROS	Espécies reativas de oxigénio
rpm	Rotações por minutos
Rt	Tempo de retenção
SD	Desvio padrão
SFA	Ácidos gordos saturados
SFB	Soro fetal bovino
SRB	Sulforodamina B
SOD	Superóxido dismutase

TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
TFA	Ácido trifluoroacético
Tr	Quantidades vestigiais
Tris	2-Amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol
U	Unidades de massa
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
UV	Ultravioleta
UV-vis	Ultravioleta visível
v/v	Relação volume/volume
w/v	Relação massa/volume

Resumo

Prunus avium L. (cereja doce) é um dos frutos de clima temperado mais popular, sendo altamente apreciado pelos consumidores e extensamente estudado pela comunidade científica. Ao contrário dos frutos que têm sido amplamente estudados, nada se sabe sobre a composição química e propriedades bioativas dos pedúnculos de *P. avium*, apesar do uso na medicina tradicional de infusões e decocções preparadas a partir dessas partes. Portanto, o objetivo deste estudo foi caracterizar frutos e pedúnculos de cereja doce quanto à sua composição nutricional, fitoquímicos individuais e propriedades bioativas. Foram estabelecidos os perfis cromatográficos em açúcares, ácidos orgânicos, ácidos gordos, tocoferóis e compostos fenólicos. Todas as preparações (extratos metanol/água 80:20 v/v, infusões e decocções) obtidas utilizando pedúnculos revelaram maior potencial antioxidante do que o extrato metanol/água obtido a partir dos frutos, o que certamente está relacionado com a maior concentração de compostos fenólicos (ácidos fenólicos e flavonoides) encontrada nos pedúnculos, em comparação com os frutos. O extrato metanol/água obtido a partir dos frutos foi o único a revelar potencial antitumoral, com especificidade para a linha celular humana HCT-15 (carcinoma do cólon) ($GI_{50} \sim 74 \mu\text{g/mL}$). Este resultado pode estar relacionado com a presença de antocianinas, que só foram encontradas nos frutos e não nos pedúnculos. Nenhuma das preparações testadas mostrou hepatotoxicidade contra células normais. No geral, o presente estudo apresenta resultados inovadores em relação à caracterização química e propriedades bioativas de pedúnculos de cereja doce, e confirmou as características nutricionais e antioxidantes dos seus frutos.

Abstract

Prunus avium L. (sweet cherry) is one of the most popular climate fruits, being highly appreciated by consumers and studied by the scientific community. In opposition to the widely studied fruits and despite the traditional medicinal use of infusions and decoctions prepared from *P. avium* stems, nothing is known about their chemical composition and bioactive properties. Therefore, the aim of this study was to characterise sweet cherry fruits and stems regarding nutritional composition, individual phytochemicals and bioactive properties. The chromatographic profiles in sugars, organic acids, fatty acids, tocopherols and phenolic compounds were established. All the preparations (methanol/water 80:20 v/v extracts, infusions and decoctions) obtained using stems revealed higher antioxidant potential than the tested methanol/water extract from fruits, which is certainly related with the higher phenolic compounds (phenolic acids and flavonoids) concentration found in stems, in comparison with fruits. The fruits methanol/water extract was the only one showing antitumor potential, revealing selectivity against HCT-15 (colon carcinoma) ($GI_{50} \sim 74 \mu\text{g/mL}$). This could be related with the presence of anthocyanins that were only found in fruits and not in stems. None of the tested preparations have shown hepatotoxicity against normal primary cells. Overall, the present study reports innovative results regarding chemical characterization and bioactive properties of sweet cherry stems, and confirmed the nutritional and antioxidant characteristics of their fruits.

1. Introdução

1.1. *Prunus avium* L.

Cerejeira é o nome dado a várias espécies de árvores que têm a sua origem no continente Asiático; são frutíferas e produtoras de madeira nobre. Pertencem à família das Rosaceae, subfamília Prunoideae, género *Prunus* e a espécie cultivada estudada no presente trabalho designa-se *Prunus avium* L. (cereja doce; **Figura 1**). *Prunus cerasus* L. (cereja ácida), da mesma família, subfamília e género é conhecida como *sour cherry* ou *tart cherry* pelos ingleses e americanos, e como ginja em Portugal (Silva & Alarcão, 1999).



Figura 1. Árvore (A); frutos e pedúnculos (B) de *Prunus avium* L.

Está descrito que a cerejeira existiu no estado selvagem na Ásia: nas florestas do Gilão (ao norte da Pérsia) e nas províncias russas do sul do Cáucaso e da Arménia; na Europa encontrava-se no sul da Rússia e, em geral, desde a Suécia meridional até às zonas montanhosas da Grécia, Itália e Espanha. Sendo um fruto conhecido e apetitoso, a cereja terá exercido grande atração nas aves (daí o nome de *Prunus avium*) que se encarregariam da dispersão dos caroços na vizinhança das plantações (De Candolle, 1883). A eventual presença da cerejeira na Europa durante o período pré-histórico foi avaliada recorrendo à arqueologia, tendo-se verificado a presença de caroços de *P. avium* em habitações palafitas de vários lagos da Suíça, mas sempre em estações menos antigas que a idade da Pedra, por

ventura já de um tempo histórico. Este facto levou os cientistas a concluir que a domesticação da espécie não se teria efetuado antes das migrações dos arianos (Silva & Alarcão, 1999).

A cereja doce (*P. avium*) é um fruto de clima temperado muito comum, por isso o seu cultivo deve ser em regiões onde o clima é frio. Além de poder ser consumida ao natural, a cereja pode ser ingrediente para a preparação de conservas, compotas, sobremesas, geleias e bebidas licorosas. As suas sementes, podem constituir 6 a 17% da massa total (Drake, 1991), contêm 30% de óleo, uma essência com ácidos cianídrico e benzóico, amigdalina e emulsina (Quer, 1995), e possuem ainda propriedades vermífugas e diuréticas. A cerejeira em geral, está distribuída geograficamente por todo o mundo, com maior predominância em zonas do Globo de clima temperado, a partir dos Trópicos indo até aos 50° de latitude Norte e de latitude Sul, pelo que engloba grande parte da Europa (mediterrânica e central), norte de África, Próximo e Extremo Oriente, Sul da Austrália e Nova Zelândia, e zonas temperadas do continente americano (Estados Unidos da América e Canadá, Argentina e Chile) (Silva & Alarcão, 1999; Mariette *et al.*, 2010; Basanta *et al.*, 2014).

Segundo a FAO (FAO, 2012), a produção mundial de cereja é de 2.292.019 t. O maior produtor é a Turquia (480.748 t), seguido pelos EUA (384.646 t) e Irão (200.000 t). A Itália é o quarto maior produtor (104.766 t), representando cerca de 5% da produção mundial de cerejas (FAO, 2012).

Nos últimos anos, a cereja tem sido alvo de particular atenção e interesse, não só apenas em Portugal mas também dentro e fora da União Europeia. O fruto toma uma posição privilegiada no seu tempo (abril-julho) próprio comparando-a com outros frutos da época (Silva & Alarcão, 1999). Por outro lado, as infusões/decoções dos seus pedúnculos (pezinhos do fruto) podem ser utilizados com fins medicinais, no combate de várias doenças.

Em suma, a cereja é um dos frutos das regiões temperadas mais apetecíveis para o consumidor, pelos seus atributos cromáticos e aromáticos, mas também pelas propriedades nutricionais e efeitos na saúde humana (Gonçalves, 2006; Gonçalves *et al.*, 2007; Usenik *et al.*, 2008; Serra *et al.*, 2010; Usenik *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Serradilla *et al.*, 2011; Ballistreri *et al.*, 2013; Pacifico *et al.*, 2014), que serão discutidos nas próximas secções.

1.2. Propriedades nutricionais de *Prunus avium* L.

P. avium (cereja doce) é um fruto pequeno, arredondado, de cor vermelha (devido à presença de antocianinas) e com polpa macia e succulenta (Gonçalves & Silva, 2008). Possui na sua composição centenas de compostos de diferentes classes: macronutrientes (hidratos de carbono, fibras, proteínas, gordura, ácidos orgânicos), micronutrientes (minerais e vitaminas) e compostos fenólicos (Gonçalves & Silva, 2008). Embora possua baixo valor calórico comparativamente a outros frutos (McCune *et al.*, 2011), tem uma quantidade moderada de hidratos de carbono, principalmente açúcares simples. Apresenta em geral açúcares invertidos, com teores entre 3-15% (Quer, 1995); de facto, da totalidade de açúcares presentes na cereja, 90% são redutores (Drake, 1991). A glucose é geralmente o açúcar presente em maior quantidade, seguido pela frutose, sorbitol e sacarose (Serrano *et al.*, 2005). Existem também oligossacáridos redutores em pequena quantidade, sendo por isso difícil a sua deteção (Constantinides & Bedford, 1964).

Haeseler & Misselhorn (1966), detetaram sorbitol (14 a 82 g/L) em quarenta e três amostras da polpa da cereja e manitol (3 a 18 g/L) em treze dessas amostras (Silva & Alarcão, 1999). Usenik *et al.* (2008) reporta um teor de açúcar entre 125 e 265 g/kg de massa fresca em amostras de treze cultivares diferentes de cereja doce, provenientes da Eslovénia; Por sua vez, Girard & Kopp (1998) discriminaram a quantidade encontrada em doze cultivares: glucose (5,2 a 8,8 g/100 g massa fresca), frutose e sorbitol (entre 4,4 e 6,4 g/100 g) e manitol (entre 2,2 e 8,0 g/100 g). Neste estudo, os mesmos autores verificaram que os sólidos solúveis variavam entre 13,5 e 24,5 °Brix. Gonçalves *et al.* (2006) descreveram valores ligeiramente mais baixos, compreendidos entre 13,0 e 21,9 °Brix, em três cultivares de cerejeira.

As fibras representam aproximadamente 2% dos nutrientes presentes na cereja (Gonçalves & Silva, 2008). Subdividem-se em duas categorias: solúveis (pectinas, gomas, algumas hemiceluloses) e insolúveis (celulose, grande parte das hemicelulose e lignina). Desempenham importantes funções para a saúde humana: controlo dos níveis de glucose no sangue; redução dos níveis de colesterol total e associado à fração lipoproteica de baixa densidade - LDL; saciedade, com efeitos laxantes suaves; controlo do peso; prevenção da diabetes, doenças cardiovasculares e cancro.

Em particular, a solubilização das substâncias pécticas é importante na alteração da textura durante a maturação do fruto. Está descrito na literatura um teor de 0,8% de pectina para o fruto fresco, sem caroço (Barbier & Thibault, 1982). Outros autores apresentaram uma média de teor péctico nas cerejas de 0,35% (0,24 a 0,54%) obtido em quatro amostras de

cerejas, sem caroço (Kertesz, 1951; Silva & Alarcão, 1999). Em cerejas verdes foi descrito um valor de 11,4% de substâncias pécicas (valor expresso em matéria seca), enquanto, que as amostras já maduras, revelaram um teor de 4,3% (Kertesz, 1951).

No que toca às proteínas de *P. avium* (cereja doce), esta apresenta em média um teor de 1,1 g/100 g (USDA, 2005; FAO, 2012). Existem também especificamente valores para variedades provenientes de diferentes países e estudadas durante vários anos: Espanhola (0,8 g/100 g), Francesa (0,9 g/100 g), Portuguesa- Fundão (0,9 g/ 100 g), Italiana (0,8 g/100 g) e Inglesa (0,9 g/100 g) (Silva & Alarcão, 1999). Winton & Winton (1935) referem ainda teores de proteína na cereja, variáveis entre 0,70 a 1,26% na polpa e 1,14 a 1,73% na parte edível. Distintos autores também referenciam dados relativos à proteína da cereja: Jacobs (1951) - 1,1%; Boland *et al.* (1965) - 0,65 a 0,85%; Duke (1985) - 1,2%; Lichou *et al.* (1990) - 0,9 a 1%, somente na parte edível (Silva & Alarcão, 1999).

A cereja não tem colesterol, mas possui outras gorduras como triglicéridos (McCune *et al.*, 2011). De acordo com USDA (2005), a gordura saturada, polinsaturada e monoinsaturada apresentou valores similares (0,1 g/100 g).

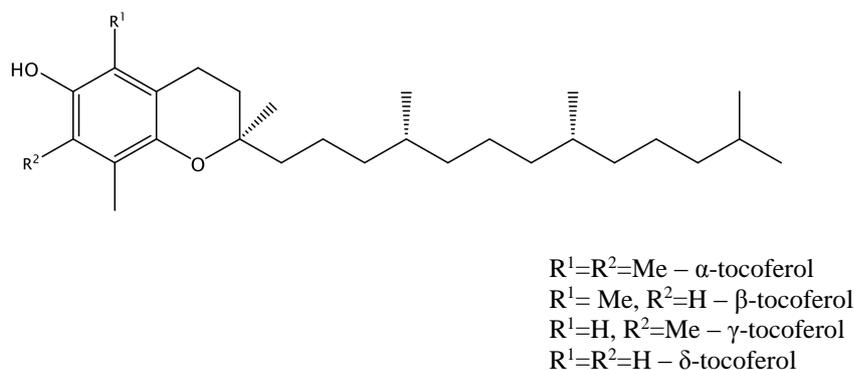
Relativamente aos ácidos orgânicos, a presença dos ácidos málico, cítrico, succínico, láctico e oxálico foi reportada na cereja, com maior predominância do primeiro (0,5 a 2% segundo Winton & Winton, 1935 e Drake, 1991; e 502 a 948 mg/100 g massa seca segundo Serrano *et al.*, 2005 e Usenik *et al.*, 2008). Outros autores descreveram também a presença de ácido salicílico (0,016%) no sumo da cereja, e uma quantidade de aldeído salicílico vinte a trinta vezes maior (Quer, 1995). É importante realçar que o equilíbrio açúcares/ácidos é fundamental para a definição da qualidade e valor das cerejas, e também do seu poder de conservação (Gonçalves & Silva, 2008).

Os sais minerais são constituintes que restam como cinzas depois da incineração dos tecidos vegetais e são necessários para o bom funcionamento do nosso organismo (Gonçalves & Silva, 2008). A cereja apresenta quantidades importantes de potássio (K), e em menor proporção fósforo (P), cálcio (Ca) e magnésio (Mg). O potássio é importante para o bom funcionamento das células, nervos e músculos do corpo. Intervém no equilíbrio da água ajudando a manter a proporção de líquidos e eletrólitos nas células e tecidos, participa na regulação da tensão arterial e do ritmo cardíaco. Dietas com um teor reduzido em sódio e elevado em potássio provocam baixas pressões sanguíneas (Looney, 1996). Pelo seu alto conteúdo em água e potássio, o consumo destes frutos tem um efeito diurético benéfico em casos de hiperuricemia (gota), cálculos renais, hipertensão e outras doenças associadas à retenção de líquidos (Gonçalves & Silva, 2008). Messina (2005) defende que

o seu consumo é conveniente quando se empregam diuréticos que eliminam o K.

Os minerais não parecem variar de forma significativa na cereja (Drake, 1991); este autor descreve o K com 191 mg/100 g de fruto, sendo o mineral com maior representatividade, seguindo-se-lhe o Ca com 22 mg/100 g de fruto, P com 19 mg, sódio (Na) com 2 mg e ferro (Fe) com 0,4 mg (Duke, 1985). Segundo a USDA (2005), a cereja doce apresenta 173 mg/100 g K, 16 mg/100 g Ca, 9 mg/100 g Mg, 3 mg/100 g Na e 0,3 mg/100 g Fe. A cereja é também uma importante fonte de boro (B), que unido ao Ca e Mg contribuem para a manutenção de um organismo saudável, sobretudo ao nível da constituição óssea (Volpe *et al.*, 1993; Gonçalves & Silva, 2008).

As vitaminas, embora sejam necessárias em baixas quantidades, são nutrientes muito importantes para o bom funcionamento do organismo. A maioria é obtida através da alimentação uma vez que o organismo não as consegue sintetizar. As vitaminas podem ser agrupadas em duas classes, as lipossolúveis (A, D, E- **Figura 2A** e K) e as hidrossolúveis (vitaminas do complexo B- B1 B2 B6 B12, ácido fólico e vitamina C- **Figura 2B**). A maior parte das vitaminas hidrossolúveis devem ser ingeridas regularmente na dieta, e o excesso é excretado ou destruído por enzimas, não podendo portanto ser armazenadas. Ao contrário, as lipossolúveis não se dissolvem na água, sendo armazenadas no organismo em grandes quantidades, de modo que o efeito da sua carência pode não se manifestar fisiologicamente durante algum tempo (Gonçalves & Silva, 2008).



A

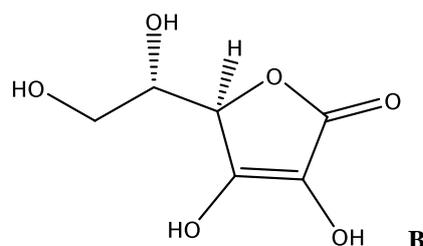


Figura 2. Exemplos de vitaminas lipossolúveis- vitamina E (**A**) e hidrossolúveis- vitamina C (**B**).

A cereja é considerada uma fonte de vitaminas, destacando-se o seu alto teor em vitamina C (ácido ascórbico), 15 mg/100 g de polpa (Gonçalves & Silva, 2008). Esta vitamina tem sido alvo de especial estudo devido às suas características bioquímicas e funções gerais farmacológicas; previne a ocorrência e desenvolvimento de doenças crónicas (doenças cardiovasculares, cancro e catarata) e é um antioxidante bastante eficaz, protegendo as moléculas indispensáveis para o organismo dos danos causados por ação dos radicais livres e espécies reativas de oxigénio (Yi *et al.*, 2009).

Duke (1985) descreveu a presença de diversas vitaminas na cereja nomeadamente, lipossolúveis: β -caroteno (pró-retinol/vitamina A) (600 μ g/100 g polpa), hidrossolúveis: tiamina (vitamina B1) (0,05 mg/100 g), riboflavina (vitamina B2) (0,06 mg/100 g), niacina (vitamina B3) (0,4 mg/100 g) e vitamina C (10 mg/100 g). Segundo Silva & Alarcão (1999) e Jacquim (1965) verificou uma variação nos teores de vitamina C entre 13-55 mg/100 g polpa de trinta e sete variedades de cereja do mesmo pomar; o mesmo autor concluiu que estes valores eram superiores aos de outros frutos com caroço, como o pêsego (17 mg), damasco (10 mg), nectarina (15 mg) e ameixa (3 mg).

Em suma, *P. avium* (cereja doce) é rica em vitaminas, minerais (K, Ca, Mg, Na, Fe e P) e proteínas. É também uma excelente fonte de boro (Pillow *et al.*, 1999), que contribui para uma boa constituição óssea (Volp *et al.*, 1993) e pode ainda alterar favoravelmente os níveis das hormonas esteróides (Samman *et al.*, 1996). Apresenta uma elevada percentagem de água (aproximadamente 80-85%; Salunkhe *et al.*, 1991), valores reduzidos de gordura, nomeadamente lípidos saturados, é isenta de colesterol e pouco calórica (USDA, 2005). Contém muitas fibras, o que auxilia no funcionamento do intestino. Adicionalmente, tem um baixo índice glicémico (Brand-Miller & Foster-Powell, 1999), podendo desta forma constituir vantagem relativamente a outros frutos e vegetais. Sendo rica em taninos, consumida em excesso pode provocar problemas estomacais.

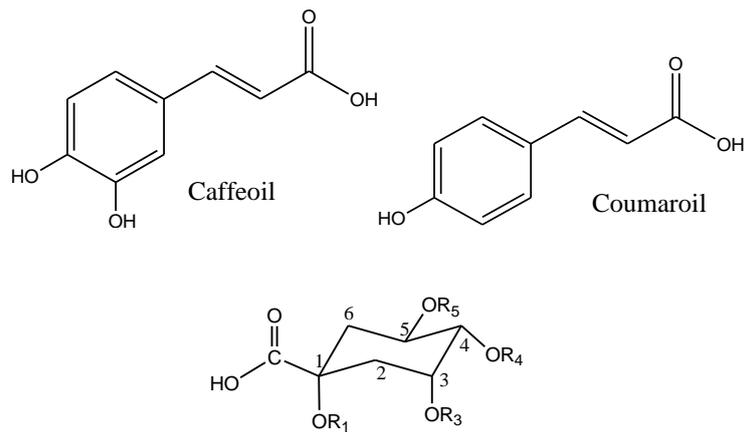
Quanto aos pedúnculos, nada está descrito sobre a sua composição em macro ou micronutrientes.

1.3. Compostos fenólicos em *Prunus avium* L.

Os compostos fenólicos são caracterizados pela presença de pelo menos um grupo hidroxilo ligado diretamente a um anel aromático (Croteau *et al.*, 2000); metabolitos secundários presentes em frutos, hortaliças, sementes e flores, e localizam-se, preferencialmente, nos tecidos mais externos das plantas, nas paredes celulares, onde a lenhina é depositada, ou nos vacúolos (Macheix *et al.*, 1990). Podem ser de baixa ou elevada massa molecular e a sua biossíntese envolve as vias do chiquimato e fenilpropanóide (Crozier *et al.*, 2006; Fraga, 2010). Estes compostos raramente se encontram livres, estando a grande maioria esterificada ou glucosilada. A estabilidade conferida a estas moléculas, proporciona inúmeros efeitos benéficos para a saúde e bem-estar humano (Fraga, 2010; Lule & Xia, 2005).

A cereja tem na sua composição diferentes compostos fenólicos (Gao & Mazza, 1995; Gonçalves *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2005; Mozetic *et al.*, 2006), que estão implicados na atividade antioxidante total. Quer a concentração destes compostos, quer a atividade antioxidante da cereja mostrou ser dependente da cultivar e das condições climáticas (Gonçalves *et al.*, 2004). Já foram identificados na cereja por HPLC-DAD, quatro grupos de compostos fenólicos: ácidos hidroxicinâmicos e três grupos de flavonoides: (flavan-3-óis, flavonóis e antocianinas) (Gonçalves & Silva, 2008). Velioglu *et al.* (1998) apresentaram uma concentração de compostos fenólicos na cereja de 2098 mg/100 g massa fresca. Por seu lado, Gao & Maza (1995) apresentam resultados de um estudo realizado com frutos de 11 cultivares de cereja doce e híbridos, referente aos teores de antocianinas e outros compostos fenólicos: para as cerejas de coloração escura descreveram um teor total de antocianinas de 82 a 297 mg/100 g de fruto descaroçado, e 2 a 41 mg para as cerejas pouco coradas.

Na cereja, os ácidos hidroxicinâmicos mais comuns são ésteres dos ácidos cafeico e *p*-cumárico (com ácido D-quinico e D-glucose). Alguns exemplos são o ácido neoclorogénico (ácido 3-*O*-cafeoilquinico com níveis entre 24 e 128 mg/100 g de fruto descaroçado e ácido (3, 4 ou 5) *p*-cumaroilquinico (**Figura 3**) entre 23 e 131 mg/100 g) verificando-se, então, uma grande variação das quantidades relativas destes dois ácidos fenólicos nas cultivares estudadas) (Silva & Alarcão, 1999) e, em menor quantidade, o ácido clorogénico (ácido 5-*O*-cafeoilquinico) (Herrmann, 1989; Gao & Mazza, 1995; Gonçalves *et al.*, 2004; Gonçalves & Silva, 2008).



- Ácido 3-*O*-cafeoilquínico, $R_3 = \text{cafeoil}$, $R_1 = R_4 = R_5 = \text{OH}$
 Ácido 5-*O*-cafeoilquínico, $R_5 = \text{cafeoil}$, $R_1 = R_3 = R_4 = \text{OH}$
 Ácido 3-*O*-*p*-cumaroilquínico, $R_3 = p\text{-cumaroil}$, $R_1 = R_4 = R_5 = \text{OH}$
 Ácido 4-*O*-*p*-cumaroilquínico, $R_4 = p\text{-cumaroil}$, $R_1 = R_3 = R_5 = \text{OH}$
 Ácido 5-*O*-*p*-cumaroilquínico, $R_5 = p\text{-cumaroil}$, $R_1 = R_3 = R_4 = \text{OH}$

Figura 3. Estrutura química dos diferentes ácidos cafeoilquínico e *p*-cumaroilquínico.

Estudos realizados por Velioglu *et al.* (1998), demonstraram que a cereja apresenta elevados valores de quercetina (**Figura 4**). Na verdade, o teor de quercetina é similar ao da maçã, que é uma das fontes principais de quercetina na dieta humana. Gonçalves *et al.* (2004) identificaram ainda dois flavan-3-óis (epicatequina e catequina). O flavonol rutina foi também detetado (Gonçalves & Silva, 2008).

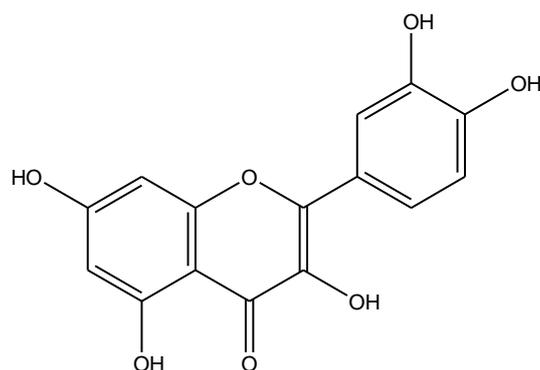


Figura 4. Estrutura química da quercetina

As antocianinas representam um grande grupo de pigmentos responsáveis pelas cores avermelhadas e azuladas de flores e frutos (Gonçalves & Silva, 2008). Segundo vários autores as cianidinas 3-*O*-rutinósido e 3-*O*-glucósido (**Figura 5**), são as mais abundantes na cereja (Gao & Mazza, 1995; Esti *et al.*, 2002; Mozetic *et al.*, 2002; Belitz *et al.*, 2004; Gonçalves *et al.*, 2004).

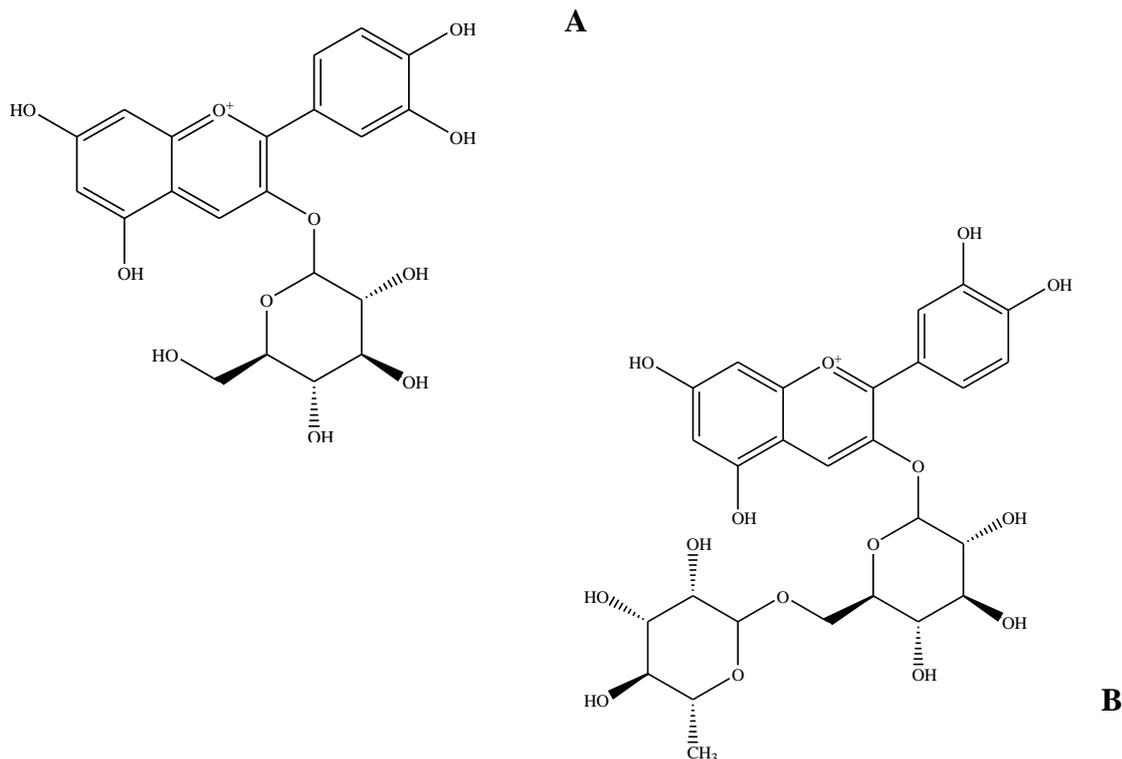


Figura 5. Estrutura química da cianidina 3-*O*-rutinósido (A) e da cianidina 3-*O*-glucósido (B).

Em menor quantidade surgem as peonidinas 3-*O*-rutinósido e 3-*O*-glucósido e a pelargonidina-3-*O*-rutinósido (Gao & Mazza, 1995; Gonçalves *et al.*, 2004). Segundo Gonçalves & Silva (2008), o teor de antocianinas nas cerejas varia significativamente com a cultivar.

Em suma, a cereja é rica em antioxidantes, designadamente compostos fenólicos e vitaminas, reconhecidos pelo seu efeito benéfico na prevenção de doenças cardiovasculares e de vários tipos de cancro (Velioglu *et al.*, 1998). Devido à elevada concentração de antocianinas, a cereja fresca é também considerada um anti-inflamatório natural (Gonçalves & Silva, 2008).

Quanto aos pedúnculos, nada se sabe sobre a sua composição em compostos fenólicos.

1.4. Atividade antioxidante de *Prunus avium* L.

Durante o metabolismo, os organismos aeróbios produzem de maneira constante radicais livres resultantes do funcionamento normal das células, mas, grande parte sob a forma de espécies reativas de oxigénio (ROS) e de azoto (RNS) (Ferreira & Abreu, 2007). Um radical livre pode ser um átomo ou uma molécula que contém um ou mais electrões desemparelhados, ou seja, tem orbitais com apenas um electrão (Gutteridge & Halliwell, 2000), sob esta forma o composto apresenta uma forte reatividade com a maioria das espécies químicas. Mas, a ingestão de substâncias com elevado poder antioxidante pode bloquear o efeito nocivo destes radicais através do fornecimento de um electrão livre que os transforma em moléculas estáveis e pouco reativas protegendo as células humanas (Gonçalves e Silva, 2008).

A classe mais importante de radicais livres gerados pelo organismo é representada pelos ROS (Ferreira & Abreu, 2007). Neste contexto, chega-se, portanto, a um paradoxo denominado por Gilbert, (2000) "o paradoxo do oxigénio ", pois, se por um lado o oxigénio molecular (O_2) é essencial à vida aeróbia, por outro, com as lesões celulares que induz por ação das ROS e que se vão acumulando a nível celular poderá ser responsabilizado pela perda de funcionalidade celular, tecidual ou orgânica que ocorre de forma progressiva com a idade, ou seja, pelo envelhecimento (Bejma *et al.*, 2000; Mota *et al.*, 2004).

Contudo, para o normal funcionamento do organismo é essencial manter o equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes, (enzimas e moléculas não enzimáticas). Pois, quando tal equilíbrio tende para a produção de radicais livres, diz-se que o organismo está em stresse oxidativo (Ferreira & Abreu, 2007), porque também os antioxidantes produzidos pelo organismo são insuficientes para combater os radicais livres por ele produzido (Alves *et al.*, 2010). Isto provoca um desequilíbrio no organismo, como consequência do excesso de radicais livres, provocando assim alterações genéticas nas células (*e.g.*, oxidar e danificar o DNA, as proteínas e as gorduras) o que leva à modificação e frequentemente a sua inutilização, inibindo-as de realizarem as suas funções normais e o aparecimento de várias doenças (Fu *et al.*, 1998; Ridnour, 2005; Ferreira & Abreu, 2007; Valko *et al.*, 2007).

Segundo Valko *et al.* (2007), danos permanentes no material genético, provocados pelo stresse oxidativo podem ser considerados o primeiro passo em situações de mutagénese, carcinogénese e envelhecimento (Ferreira & Abreu, 2007). Portanto, determinadas situações favorecem a produção de radicais livres, como sejam a contaminação ambiental, o fumo do cigarro, as infeções, situações de stresse e dietas ricas em gorduras (Messina,

2005). Assim, pode-se afirmar que o stress oxidativo pode ter causas naturais, como o que ocorre em situações de exercícios físicos extremo, ou em processos de inflamação; mas também pode ter causas não naturais como a presença de xenobióticos no organismos ou em situações relacionadas com várias doenças (Ferreira *et al.*, 2009). De salientar que, a produção não controlada de radicais livres está associada como causa, ou como estando relacionada com mais de uma centena de doenças incluindo: vários tipos de cancro, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares e desordens do foro neurológico entre outras (Halliwell, 1984; Halliwell, 1996; Valko *et al.*, 2007).

A exposição do organismo aos radicais livres conduz ao desenvolvimento de mecanismos de defesa endógena para os eliminar, como resposta à inevitabilidade da existência de ROS em condições aeróbias. Os produtos naturais (sementes, cereais, vegetais, frutos, folhas, raízes, especiarias, ervas) estão envolvidos na redução do risco das doenças, como o cancro, devido ao potencial antioxidante, mas, também servem de auxílio para o sistema protetor endógeno; já os antioxidantes presentes na dieta assumem grande importância como possíveis protetores, reduzindo os danos oxidativos (Kanter, 1998; Ferreira & Abreu, 2007). Não obstante a isto, é importante salientar que se encontram espalhadas por todo o organismo, tanto no meio intracelular como no meio extracelular, defesas antioxidantes enzimáticas como a superóxido dismutase (SOD), a catalase (CAT), a glutathione peroxidase (GPH-Px), a glutathione reductase (GPHR), entre outras, e, por outro lado as não enzimáticas, destacando-se compostos como a glutathione (GSH) o α -tocoferol (vit. E), o ácido ascórbico (vit. C), o ácido lipóico, os carotenoides, os flavonoides e outros (Valko *et al.*, 2007). Estas enzimas estão intimamente relacionadas no diz respeito ao funcionamento, pelos seguintes factos: a SOD, converte o anião superóxido em peróxido de hidrogénio que é de seguida transformado em água pela CAT nos lisossomas, ou pela GSH-Px nas mitocôndrias; outra enzima importante é a GSH – R que regenera a GSH, é utilizada pela CAT como dadora do hidrogénio necessário para a redução do peróxido de hidrogénio em água (Johansen *et al.*, 2005); as gorduras hidroperóxidos podem ser transformadas em álcoois (LOH) também pela GSH-Px. A GSH é um tripéptido de baixa massa molecular, composto por glutamato, cisteína (com um grupo tiol) e glicina, é muito abundante, sendo o principal tampão redox intracelular, sua capacidade para regenerar as moléculas antioxidantes mais importantes está ligada ao estado redox do par Glutathione dissulfito/Glutathione (GSSG/GSH) (Pastore *et al.*, 2003), como defesa antioxidante, desempenha várias funções: é um quelante de radicais (HO^\bullet , H_2O_2 , LOO^\bullet , e ONOO^-) quer reagindo diretamente com estes, quer indiretamente como co-fator de enzimas

antioxidantes como a GSHPx e a GSH-T, participa no processo de neutralização dos radicais livres onde ela é oxidada, gerando a formação de radicais GS• que também é reativo, pois, rapidamente reage com um segundo radical GS• formando a molécula glutatona dissulfito (GS-SG) não oxidante. A GS-SG, reduzida a duas GSH pela enzima GPH-R, e a GSH é utilizada para regenerar ao seu estado ativo outras moléculas antioxidantes como a vitamina C e a Vitamina E (Ferreira & Abreu, 2007) e ainda, reage com uma grande variedade de xenobióticos electrofílicos e, conjuntamente com a enzima GSG-T, torna estes compostos mais solúveis e facilmente excretáveis. Um dos conjugados formados por ela, é a S-nitrosoglutatona (GSNO) originária da reação da GSH com o óxido nítrico (NO•) (Fang *et al.*, 2002).

A vitamina E (vit. E) é uma vitamina lipossolúvel que por se encontrar nas membranas, previne mais facilmente a peroxidação lipídica; pode ser encontrada em 8 diferentes formas, das quais o α -tocoferol é a mais ativa em humanos. O ROS (radical hidroxilo, radical peroxilo, entre outros) reage como a vit. E formando um radical fenólico pouco reativo (vit. E•); enquanto, a vitamina C (vit. C) ao reagir com o radical fenólico da vitamina E entretanto formado (vit. E•), regenerando-a à sua forma inicial. Os radicais; vit. E• e o radical da vitamina C (vit. C•) não sendo espécies reativas o seu eletrão desemparelhado é energeticamente estável (Fang *et al.*, 2002; Henley *et al.*, 2004).

Os antioxidantes podem ser substâncias naturais (enzimas ou outras substâncias orgânicas) ou sintéticas que previnem ou retardam os efeitos prejudiciais da oxidação em diferentes tecidos (Ferreira & Abreu, 2007).

Exemplos de antioxidantes presentes na cereja são as vitaminas (C e E) e os compostos fenólicos. As vitaminas têm um papel importante na remoção dos radicais livres, moléculas ou iões instáveis produzidos pelo organismo como consequência do seu metabolismo normal. Os compostos fenólicos, não sendo sintetizados pelo organismo, têm que ser obtidos por ingestão de alimentos de origem vegetal ou através da introdução na dieta de suplementos alimentares (Aherne & O`Brein, 2002). Segundo os estudos de Gonçalves *et al.* (2004), a presença de rutina e outros flavonoides nomeadamente, catequina, epicatequina e antocianinas, fazem da cereja uma importante fonte de antioxidantes para o bem-estar humano (Gonçalves & Silva, 2008). Os ácidos fenólicos também são excelentes antioxidantes presentes na cereja (Radtke *et al.*, 1998; Gonçalves & Silva, 2008). Na verdade, os compostos fenólicos apresentam atividade anti-inflamatória e evitam a aglomeração das plaquetas sanguíneas, desempenhando uma importante ação nos radicais

livres do organismo de forma a proteger o DNA, gorduras e proteínas da oxidação (Halliwell, 1990).

Assim sendo, este fruto pode ser uma fonte importante de antioxidantes exógenos já que o valor médio de ingestão de flavonoides é 23 mg/dia com predominância de flavonóis, especialmente quercetina (Hertog & Hollman, 1996). Este flavonol inibe a peroxidação lipídica potenciada pelo ferro e a produção de óxido nítrico no fígado, alterando vias de expressão de proteínas celulares (Martínez- Flórez *et al.*, 2002; Gonçalves & Silva, 2008). O valor mencionado para os flavonoides é superior ao de outros antioxidantes da dieta, tais como β -caroteno (2 a 3 mg/dia) e vitamina E (7 a 10 mg/dia), sendo aproximadamente um terço do valor da vitamina C (70 a 100 mg/dia) (Rice-Evans & Pscker, 1998).

Velioglu *et al.* (1998), descreveram uma correlação positiva entre a concentração de fenóis totais e a atividade antioxidante da cereja (Gonçalves *et al.*, 2004). Realça-se ainda o facto das cianidinas, antocianinas predominantes na cereja (Gao & Mazza, 1995), serem facilmente absorvidas (Cao & Prior, 1999). O mesmo acontece com outros flavonoides e ácidos hidroxicinâmicos (Bourne & Rice-Evans, 1999; Gonçalves & Silva, 2008).

Outros antioxidantes descritos na cereja incluem a melatonina, substância solúvel em água e em gorduras, importante regulador do sono, e β -sitosterol, um fito-esterol (Gonçalves & Silva, 2008).

Usenik *et al.* (2008) sugeriram, numa experiência realizada com frutos de treze cultivares de cereja doce provenientes da Eslovénia, que a atividade antioxidante da cereja não está simplesmente relacionada com compostos fenólicos (incluindo antocianinas); isto porque cultivares com baixo teor de compostos fenólicos (e antocianinas), apresentaram elevada atividade antioxidante (Usenik *et al.*, 2008), devido à presença de outras substâncias nomeadamente ácidos orgânicos.

Segundo Liu (2003), a ocorrência de efeitos aditivos e sinérgicos por parte dos fitoquímicos presentes em frutos e vegetais pode levar a consideráveis benefícios para a saúde. Uma dieta enriquecida com estes alimentos é altamente benéfica devido à complexa mistura de fitoquímicos presentes, pois, um antioxidante por mais eficaz que seja, não pode substituir a combinação de fitoquímicos naturais existentes nos alimentos (Ferreira & Abreu, 2007). Estudos epidemiológicos (Willett, 1994; Block *et al.*, 1992; Sorg, 2004; Aggarwal & Shishodia, 2006) indicam que populações que consomem frutas e vegetais (ricas em antioxidantes) têm menor probabilidade de desenvolver cancro e outras doenças crónicas. De facto, parece existir de uma relação inversa entre uma dieta rica em

antioxidantes e a incidência de doenças como: cancro, artrite reumatoide, trombose e aterosclerose, podendo estes compostos terem ainda um papel preponderante na redução de doenças neurodegenerativas, como a de Alzheimer e a de Parkinson (Gonçalves & Silva, 2008). Assim sendo, uma dieta do tipo mediterrânica (dieta com inclusão de fruta), que inclua a ingestão de cerejas, poderá ser benéfica na prevenção de algumas das doenças mencionadas.

Os pedúnculos (pezinhos do fruto), em infusão ou decocção, são utilizados como calmante, drenante e diurético. Parecem ser úteis no tratamento de doenças reumáticas, diminuindo o ácido úrico, e no combate à litíase (pedras) dos rins e vesícula biliar, tosse, catarros pulmonares crónicos e infeções como a gota, artrite e inflamações das vias urinárias (*e.g.*, nefrite, cistite). Associada às propriedades diuréticas (Hooman *et al.*, 2009; Di Cagno *et al.*, 2011), também podem ser utilizados em programas de emagrecimento já que promovem a micção e eliminação de toxinas.

No entanto, não existem estudos de caracterização química de compostos bioativos presentes nos pedúnculos nomeadamente, nas formas em que são consumidos, infusão e decocção. Assim, a partir deste facto, resulta a importância do estudo realizado, como forma de confirmação científica das propriedades antioxidantes dos pedúnculos e do seu potencial medicinal.

1.5. Atividade antitumoral de *Prunus avium* L.

O cancro é uma das principais causas de morte (Jemal *et al.*, 2011), tendo sido responsável por 7,6 milhões de mortes em todo o mundo, em 2008; das quais, 64% ocorreram em países em desenvolvimento (Carocho & Ferreira, 2013). Este aumento deve-se, entre outras causas, a comportamentos como o tabagismo e dietas desequilibradas. Para reduzir a incidência da doença e consequente mortalidade, a humanidade esforça-se para encontrar tratamentos melhores (rápidos, eficientes, específicos para os diferentes tipos de cancros) que sejam baratos e com poucos efeitos colaterais. No entanto, a resistência aos medicamentos tem sido uma limitação, e pode estar associada a alterações do local de ligação do alvo, metabolismo e alterações genéticas e epigenéticas (Foo & Michor, 2010). Dados epidemiológicos revelam que a incidência de cancro no mundo depende do tipo de cancro e de hábitos de vida, entre outros fatores. Assim, determinados cancros são mais comuns que outros, *e.g.*, cancro do pulmão, cólon, próstata e mama são muito comuns nos países ocidentais e pouco prevalecem em países orientais; os cancros de cabeça, pescoço e cólon do útero são mais comuns na Índia, enquanto o cancro de estômago tem maior

predominância no Japão (Ziegler *et al.*, 1993; Wiencke, 2004). Schottenfeld & Jr (2006) afirmam que a profilaxia e tratamento destas doenças envolvem gastos monumentais; mais de 60 milhões de dólares foram gastos em 2002, nos Estados Unidos, o que constitui um grande impacto económico.

Desde os tempos mais remotos, que as plantas são usadas como medicamentos naturais para tratar diferentes doenças e lesões obtendo-se, em alguns casos, resultados satisfatórios. Por outro lado, mais de 60% dos medicamentos anticancerígenos provêm de compostos naturais ou são derivados destes (Rocha *et al.*, 2001; Gordaliza, 2007).

Vários extratos de plantas têm exibido efeitos antitumorais em linhas celulares modelo, muitas vezes relacionados com sinergias entre vários compostos. No entanto, é muitas vezes impossível identificar um único composto ativo que possa ser isolado para o desenvolvimento de fármacos (Carocho & Ferreira, 2013). Assim sendo, torna-se muito mais interessante explorar o consumo de plantas como fonte de compostos preventivos (*e.g.*, antioxidantes) no aparecimento de doenças crónicas como o cancro, do que o desenvolvimento de formulações farmacêuticas a utilizar no seu tratamento.

De facto, o consumo de cerejas doce ou amarga tem sido associado a diferentes efeitos benéficos na saúde humana nomeadamente, na diminuição do risco de cancro (Kang *et al.*, 2003; Beattie *et al.*, 2005). Estes efeitos têm sido relacionados com a sua composição em compostos fenólicos, nomeadamente ácidos fenólicos (hidroxicinâmicos) e flavonoides (antocianinas, flavan-3-óis e flavonóis), e consequente atividade antioxidante (Gao e Mazza, 1995; Yilmaz & Toledo 2004; Gonçalves *et al.*, 2004; Gonçalves & Silva, 2008).

A ingestão de compostos bioativos de frutas e legumes (*e.g.*, polifenóis e terpenos), podem contribuir para reduzir a incidência de cancro (Kris- Etherton *et al.*, 2002). Nos últimos anos, o potencial antitumoral de compostos fenólicos tem sido estudado e demonstrado (Carocho & Ferreira, 2013). Por exemplo, o ácido elágico, também encontrado na cereja, parece ter propriedades anticarcinogénicas, para além de ajudar a combater infeções microbianas. Crowell *et al.* (1996), descreveram também que o álcool perílico, um monoterpeneo de elevado poder antioxidante encontrado na cereja, apresenta atividade antitumoral (Gonçalves & Silva, 2008). Este mesmo composto foi submetido a ensaios de quimioprevenção para o cancro da próstata, mama e cólon (Greenwald *et al.*, 2002). Serra *et al.* (2011), afirmaram que esta substância é um dos principais responsáveis pelas propriedades anticancerígenas de *P. avium*. Estas propriedades foram avaliadas pela inibição da proliferação de linhas celulares, nomeadamente células Caco-2 completamente diferenciadas por serem um bom modelo de barreira intestinal (Yuri *et al.*, 2004; Bardon *et*

al., 2002; Sambuy *et al.*, 2005), superação da sua resistência (Samaila *et al.*, 2004; Rajesh *et al.*, 2003), análise de indução de paragem do ciclo celular através da técnica de citometria de fluxo e indução de apoptose (Burke *et al.*, 2002; Elegbede *et al.*, 2003).

No entanto, não existem estudos na literatura relativos aos pedúnculos.

2. Objetivos

Prunus avium (L.) é vulgarmente conhecido como cerejeira e pertence à família Rosaceae. Os frutos maduros são altamente apreciados para consumo em fresco, enquanto as infusões/decoções dos seus pedúnculos (pezinhos do fruto) podem ser utilizados com fins medicinais, *e.g.*, combate à obesidade, gota, artrite, infeções urinárias e anemias; apresentam também ação depurativa, adstringente, laxante, béquica e diurética, mas nada se sabe sobre sua composição química e propriedades bioativas (Hooman *et al.*, 2009; Di Cagno *et al.*, 2011). Assim, este trabalho teve como principais objetivos:

- I. Caracterizar quimicamente o fruto maduro e o pedúnculo de *P. avium* no que concerne à sua composição em macronutrientes e compostos individuais hidrofílicos e lipofílicos.
 - a. Determinação de macronutrientes (humidade, gordura, proteínas, hidratos de carbono e valor energético) segundo protocolos oficiais de análise de alimentos.
 - b. Análise de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI).
 - c. Análise de ácidos orgânicos por HPLC acoplada a um detetor de fotodíodos (HPLC-DAD).
 - d. Análise de ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (GC-FID).
 - e. Análise de tocoferóis por HPLC acoplada a um detetor de fluorescência (HPLC-Fluorescência).
- II. Avaliar as propriedades bioativas do fruto maduro (extrato metanol/água 80:20, v/v) e do pedúnculo de *P. avium* (infusão, decoção e extrato metanol/água).
 - a. Avaliação da atividade antioxidante pelo efeito captador de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica em homogeneizados cerebrais (ensaios *in vitro*).
 - b. Avaliação da citotoxicidade em cinco linhas celulares tumorais humanas: MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HCT-15 (carcinoma de cólon), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular); e numa cultura primária de células de fígado de porco (PLP2).
 - c. Análise de compostos fenólicos por HPLC acoplada a detetores de díodos e espectrometria de massa com ionização com *spray* de eletrões (HPLC-DAD/ESI-MS).

3. Material e Métodos

3.1. Padrões e Reagentes

Os solventes *n*-hexano 95%, acetonitrilo 99% e acetato de etilo 99,98%, grau HPLC, foram adquiridos à Fisher Scientific (Loures, Portugal). O solvente metanol, grau analítico, foi adquirido na Pronalab (Lisboa, Portugal). Todos os outros solventes usados eram de grau analítico: metanol e éter etílico, da marca Lab-Scan, tolueno e ácido sulfúrico, da marca Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (C4-C24; norma 47885-U) foi adquirida na Sigma, assim como outros isómeros individuais de ácidos gordos, padrões de açúcares, padrões de ácidos orgânicos, padrões de tocoferóis e o padrão utilizado nos ensaios da atividade antioxidante: trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). Os padrões de compostos fenólicos foram obtidos na Extrasynthesis (Genay Cedex, França). O tocol racémico, 50 mg/mL foi fornecido pela Matreya (Pleasant Gap, Pensilvânia, EUA). O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, EUA). Os restantes reagentes químicos utilizados foram adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EUA).

O soro fetal bovino (SFB), a L-glutamina, a solução salina de Hank's (HBSS), a tripsina-EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético), os aminoácidos não essenciais (2 mM), a penicilina/estreptomincina (100 U/mL e 100 mg/mL, respetivamente), e os meios de cultura RPMI-1640 e DMEM foram adquiridos à Hyclone (Logan, EUA).

O ácido acético, a elipticina, a sulforodamina B (SRB), o azul tripano, o ácido tricloroacético (TCA) e o Tris (2-amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol) foram também adquiridos à Sigma (St. Louis, MO, EUA). A água utilizada foi tratada num sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water System, Greenville, Carolina do Sul, EUA).

3.2. Material vegetal

Frutos e pedúnculos de *Prunus avium* L. foram selecionados de forma aleatória e recolhidos em Junho de 2013, a partir de plantas cultivadas em Bragança (nordeste de Portugal). Após a recolha, procedeu-se à separação dos frutos e dos pedúnculos. A identificação da espécie em estudo foi confirmada pelo botânico, Professor Doutor Carlos Aguiar da Escola Superior Agrária, Instituto Politécnico de Bragança (Portugal).

As amostras foram liofilizadas (Liofilizador Labconco), trituradas (~20 mesh) e armazenadas num exsiccador, protegidas da luz, até posterior análise.

3.3. Caracterização química de *Prunus avium* L.

3.3.1. Macronutrientes e valor energético.

Para determinação da composição química dos frutos, analisou-se humidade, proteínas, gordura, hidratos de carbono e cinzas, utilizando os procedimentos AOAC (1995). As proteínas totais ($N \times 6,25$) foram estimadas pela técnica macro-Kjeldahl. A gordura total foi determinada após extração de uma massa conhecida da amostra com éter de petróleo, utilizando o aparelho de Soxhlet. As cinzas foram determinadas por incineração a 660 ± 15 °C. Os hidratos de carbono foram calculados por diferença: $100 - (\text{massa proteínas} + \text{massa gordura} + \text{massa cinzas})$. A energia total foi calculada de acordo com a seguinte equação: Energia (Kcal) = $4 \times (\text{massa proteínas} + \text{massa hidratos de carbono}) + 9 \times (\text{massa gordura})$.

3.3.2. Compostos hidrofílicos

Açúcares. Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), conforme descrito por Barros *et al.* (2010a) com algumas modificações. Cada uma das amostras de frutos e pedúnculos (1 g) foi enriquecida com melezitose como padrão interno (PI, 5 mg/mL) e foi extraída com 40 mL de etanol aquoso 80%, a 80 °C, durante 30 min. A suspensão resultante foi centrifugada (centrífuga refrigerada Centorion) a 15,000g durante 10 min. O sobrenadante foi concentrado a 60 °C sob pressão reduzida; os vestígios de gordura foram removidos em três lavagens sucessivas com 10 mL de éter etílico. Após a concentração a 40 °C, os resíduos sólidos foram dissolvidos em água para um volume final de 5 mL. Os açúcares foram determinados usando o HPLC (Knauer, sistema Smartline) a 35 °C. O sistema de HPLC estava equipado com um detetor de RI (Knauer Smartline 2300) e com uma coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6×250 mm, 5 mm, Knauer). A fase móvel foi acetoneitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de 1 mL/min. A identificação dos açúcares foi feita comparando os tempos de retenção relativos dos picos das amostras com padrões. Os resultados foram obtidos pelo método do padrão interno e expressos em g por 100 g de massa fresca.

Ácidos orgânicos. Os ácidos orgânicos foram determinados após um procedimento previamente descrito por Pereira *et al.* (2013). As amostras de frutos e pedúnculos (2 g) foram extraídos por agitação com 25 mL de ácido metafosfórico (25 °C a 150 rpm) durante 45 min e, filtradas através de papel Whatman N ° 4. Posteriormente, a amostra foi filtrada

através de filtros de nylon de 0,2 μm . A análise foi realizada utilizando uma série Shimadzu 20A series UFLC (Shimadzu Corporation). A separação foi conseguida através de uma (Phenomenex), coluna de fase inversa C18 SphereClone (5 μm , 250 \times 4,6 mm), termostaticado a 35 ° C. A eluição foi realizada com ácido sulfúrico 3,6 mM usando um caudal de 0,8 mL/min. A deteção foi levada a cabo num DAD, utilizando 215 nm e 245 nm (para o ácido ascórbico) como comprimentos de onda. Os ácidos orgânicos encontrados foram quantificados por comparação da área dos seus picos registados a 215 nm com as curvas de calibração obtidas a partir de produtos comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa fresca.

3.3.3. Compostos lipofílicos

Ácidos gordos. Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com deteção por ionização de chama (GC-FID), como descrito anteriormente por Barros *et al.* (2010a), e após o seguinte processo de trans-esterificação. A massa obtida por extração em Soxhlet dos frutos e pedúnculos foi misturada com 5 mL de metanol/ácido sulfúrico/tolueno 2:1:1 (v/v/v), durante pelo menos 12 h, num banho a 50 °C a 160 rpm; de seguida, adicionaram-se 3 mL de água desionizada, para obter a separação das fases. A FAME foi recuperada com 3 mL de éter etílico em agitação no *vortex*; fez-se passar o sobrenadante através de uma microcoluna de sulfato de sódio anidro, a fim de eliminar a água; recuperou-se a amostra para um *vial* com tampa contendo membrana de teflon e filtrou-se com um filtro de nylon 0,2 μm Milipore. O perfil de ácidos gordos foi obtido num GC modelo DANI 1000 equipado com um injetor *split/splitless*, detetor de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey Nagel (30 m \times 0,32 mm \times 0,25 μm). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi 50 °C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 30 °C/min até 125 °C, 5 °C/min até 160 °C, 20 °C/min até 180 °C, 3 °C/min até 200 °C, 20 °C/min até 220 °C que permaneceu durante 15 min. O gás de transporte (hidrogénio) tinha um caudal de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250 °C. Para cada análise, injetou-se 1 μL da amostra. A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos da FAME e das amostras. Os resultados foram processados usando o software CSW 1,7 (DataApex 1,7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

Tocoferóis. Os tocoferóis foram determinados segundo um procedimento previamente otimizado e descrito por Barros *et al.* (2010b). Antes do processo de extração, adicionou-se às amostras de frutos e pedúnculos (500 mg) uma solução BHT em hexano (10 mg/mL; 100 µL) e uma solução de PI em hexano (tocol: 50 µg/mL; 400 µL). As amostras foram homogeneizadas com metanol (4 mL) no vortex (1 min). Posteriormente, adicionou-se hexano (4 mL) e homogeneizou-se novamente no vortex durante 1 min. Seguidamente, adicionou-se uma solução aquosa concentrada de NaCl (2 mL), homogeneizou-se (1 min) e centrifugou-se (5 min, 4000g). O sobrenadante foi, cuidadosamente, transferido para um vial. A amostra foi re-extraída mais duas vezes com hexano. Os extratos combinados foram levados à secura sob corrente de azoto, re-dissolvidos em 2 mL de hexano, desidratados com sulfato de sódio anidro, filtrados através de um filtro descartável LC de 0,22 µm, transferidos para um vial de injeção âmbar e analisados no HPLC. O equipamento de HPLC consistia num sistema integrado com uma bomba Smartline 1000 (Knauer), um desgaseificador Smartline 5000, um amostrador automático AS-2057 2500 e um detetor de fluorescência (Jasco) programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. Os dados foram analisados usando o software Clarity 2,4 (DataApex). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna em fase normal Poliamida II (250×4,6 nm) YMC Waters operando a 30 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel utilizada foi uma mistura de hexano e acetato de etilo (70:30, v/v) com um caudal de 1 mL/min. A quantificação foi baseada na resposta do sinal de fluorescência, usando o método do padrão interno e por comparação cromatográfica com padrões. Os resultados foram expressos em µg por 100 g de massa fresca.

3.4. Preparação de extratos para avaliação da bioatividade e análise de compostos fenólicos

Para a preparação das infusões, às amostras liofilizadas de pedúnculos (1 g) foi adicionada água destilada (200 mL) previamente fervida (placa de aquecimento, VELP scientific); deixou-se repousar durante 5 min.

Para a preparação das decocções, às amostras liofilizadas de pedúnculos (1 g) foi adicionada a água destilada (200 mL), aqueceu-se a mistura até à ebulição e deixou-se a essa temperatura durante 5 min; filtrou-se em papel Whatman nº 4.

Para ambas as preparações deixou-se arrefecer o filtrado à temperatura ambiente e posteriormente, congelou-se e liofilizou-se.

Para obtenção dos extratos metanol/água, as amostras liofilizadas de frutos e pedúnculos (1 g) foram submetidas a uma extração sólido-líquido com 40 mL de metanol/água (80:20, v/v) em placa de agitação (a 25 °C a 150 rpm), durante 1h e posteriormente filtradas através de papel Whatman nº 4. O resíduo sólido obtido foi re-extraído sob as mesmas condições. Os extratos líquidos combinados foram evaporados num evaporador rotativo (Büchi R-210) a 40 °C de forma a remover o metanol. Para a purificação, fez-se passar a solução de extrato num cartucho C-18 SepPak[®] Vac 3 cc (Phenomenex), previamente ativado com metanol e, posteriormente, água; os açúcares e as substâncias mais polares foram removidos passando 15 mL de água e os extratos concentrados em compostos fenólicos foram eluídos com 5 mL de metanol, sendo depois concentrados num evaporador rotativo até à secura total.

Para os ensaios de avaliação da atividade antioxidante e caracterização dos compostos fenólicos, os extratos metanol/água e as infusões e decocções foram redissolvidos em metanol/água (80:20, v/v) e água, respetivamente, de forma a obter uma solução com uma concentração de 20 mg/mL (para a atividade antioxidante) e 5 mg/mL (para a caracterização dos compostos fenólicos). Para os ensaios de avaliação da atividade antitumoral todas as preparações foram redissolvidas em água de forma a obter uma solução com concentração de 8 mg/mL.

A partir destas soluções iniciais foram preparadas várias soluções com concentrações diferentes, a partir do método das diluições sucessivas. Estas soluções foram utilizadas na realização dos diferentes ensaios de avaliação da bioatividade.

3.5. Avaliação da atividade antioxidante

3.5.1. Atividade captadora de radicais DPPH

A atividade captadora de radicais DPPH foi monitorizada utilizando um leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc.). Todas as diluições das amostras, previamente preparadas (30 µL), foram colocadas nos diferentes poços das microplacas (96 poços) e posteriormente foram adicionados 270 µL de uma solução de DPPH (6×10^{-5} mol/L). A mistura foi colocada no escuro durante cerca de 30 min e a absorvância foi medida a um comprimento de onda de 515 nm. A atividade captadora do radical (ACR) foi calculada como percentagem de descoloração da solução DPPH utilizando a fórmula % ACR= $[(Abs_{DPPH} - Abs_s)/Abs_{DPPH}] \times 100$ onde Abs_{DPPH} corresponde à absorvância da

solução de DPPH e Abs_s à absorvância da solução de DPPH na presença da amostra. O valor de EC₅₀ (concentração de amostra responsável pela captação de 50% de radicais DPPH) foi calculado por interpolação gráfica da percentagem de ACR em função da concentração da amostra. Utilizou-se trolox como padrão (Dias *et al.*, 2013; Roriz *et al.*, 2014).

3.5.2. Poder redutor

Esta metodologia foi realizada utilizando o Leitor de Microplacas descrito anteriormente. As diferentes concentrações das amostras (0,5 mL) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mol/L, pH 6,6, 0,5 mL) e adicionou-se ferricianeto de potássio (1% w/v, 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min e adicionou-se ácido tricloroacético (10% w/v, 0,5 mL). A mistura (0,8 mL) foi colocada nos 48 poços juntamente com água desionizada (0,8 mL) e cloreto férrico (0,1% w/v, 0,16 mL), a absorvância foi medida a 690 nm. A concentração de amostra que fornece 0,5 de absorvância (EC₅₀) foi calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração da amostra. Utilizou-se trolox como padrão (Dias *et al.*, 2013; Roriz *et al.*, 2014).

3.5.3. Inibição da descoloração do β-caroteno

Preparou-se uma solução por dissolução de β-caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 mL). Transferiram-se 2 mL desta solução para um balão de fundo redondo. Após remoção do clorofórmio a 40 °C, sob vácuo, juntou-se ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL) e agitou-se vigorosamente. Transferiu-se uma alíquota (4,8 mL) desta emulsão para tubos de ensaio contendo diferentes concentrações das amostras (0,2 mL). Os tubos foram agitados e incubados a 50 °C em banho-maria. Imediatamente após a adição da emulsão a cada tubo, mediu-se a absorvância a 470 nm no tempo zero. A inibição da descoloração do β-caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação: (conteúdo de β-caroteno após 2 h de ensaio/conteúdo inicial de β-caroteno) 100. A concentração de amostra correspondente a 50% de atividade antioxidante (EC₅₀) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do β-caroteno em função da concentração de amostra. Utilizou-se trolox como padrão (Dias *et al.*, 2013; Roriz *et al.*, 2014).

3.5.4. Inibição da peroxidação lipídica através do ensaio das espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Utilizou-se tecido cerebral de porco (*Sus scrofa*; com cerca de 150 Kg de peso), dissecado e homogeneizado em gelo com tampão Tris-HCl (20 mM, pH 7,4) numa proporção 1:2 (w/v) e após centrifugação a 3000g durante 10 min. Incubou-se uma alíquota (0,1 mL) do sobrenadante com as diferentes concentrações das amostras (0,2 mL), FeSO₄ (10 µM; 0,1 mL) e ácido ascórbico (0,1 mM; 0,1 mL) a 37 °C durante 1 h. A reação foi interrompida pela adição de ácido tricloroacético (28% w/v; 0,5 mL), seguindo-se a adição do ácido tiobarbitúrico (TBA; 2%, w/v; 0,38 mL). A mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min. Após centrifugação a 3000g durante 10 min para remoção de proteínas, a intensidade da cor do complexo malonaldeído (MDA) -TBA do sobrenadante foi medida através da sua absorvância a 532 nm. A percentagem de inibição da peroxidação lipídica (%) foi calculada utilizando a seguinte fórmula: $[(A - B)/A] \times 100\%$, onde A e B eram as absorvâncias do controlo e da solução com o extrato, respetivamente. A concentração de amostra correspondente a 50% de inibição da peroxidação lipídica (EC₅₀) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de amostra. Utilizou-se trolox como padrão (Dias *et al.*, 2013; Roriz *et al.*, 2014).

3.6. Avaliação do potencial antitumoral e citotoxicidade

3.6.1. Atividade antiproliferativa em linhas celulares tumorais humanas

Foram utilizadas cinco linhas celulares tumorais humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HCT-15 (carcinoma de cólon), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular). As células foram mantidas em cultura de células aderentes em meio RPMI-1640 contendo 10% de Soro Fetal de Bovino (SFB) inativado pelo calor e 2 mM de glutamina (MCF-7, NCI-H460, HCT-15, HeLa e HepG2), a 37 °C, em incubadora com temperatura humidificada contendo 5% de CO₂ (HF 151, Heal Force) (Guimarães *et al.*, 2013). Todas as experiências foram realizadas em ambiente asséptico numa câmara de fluxo laminar vertical (TLStar, AV-30/70). Retirou-se o meio de cultura de cada caixa de cultura com as respetivas linhas celulares. Adicionou-se o meio de lavagem (HBSS, 2 mL) e após a sua remoção adicionou-se tripsina (1,5 mL). A caixa de cultura foi colocada na incubadora durante 3 min para desagregação das células. Adicionou-se rapidamente meio de cultura (3 mL) para inativar a tripsina. Pipetou-se a suspensão celular para um tubo de falcon estéril para centrifugar (1200 rpm, 5 min.).

Retiraram-se 50 µL de suspensão e adicionaram-se 50 µL de solução de azul tripano para contagem do número de células numa câmara de Neubauer.

Cada linha celular foi plaqueada numa densidade apropriada ($7,5 \times 10^3$ células/poço para MCF-7, NCI-H460, HCT-15, HeLa e HepG2) numa placa de 96 poços. Adicionaram-se 5 diluições das amostras (10 µL) em cada poço, juntamente com o volume de células calculado anteriormente. Perfez-se o volume de cada poço com meio de cultura. As microplacas foram seladas e guardadas na incubadora durante 48h até ao teste da sulforodamina B (SRB). Neste teste, adicionou-se a cada poço ácido tricloroacético frio (TCA, 10%; 100 µL), incubando-se de seguida durante 60 min a 4 °C. As microplacas foram lavadas com água destilada e secas. A solução de SRB (0,1% em 1% ácido acético; 100 µL) foi adicionada a cada poço. A placa foi incubada durante 30 min à temperatura ambiente. Posteriormente, lavou-se a placa com ácido acético (1%) para remover o excesso de SRB e secou-se. A SRB foi solubilizada com 10 mM de Tris (200 µL, pH 7,4) num agitador de microplacas (Stat Fax-2100). A absorvância foi medida a 540 nm num leitor de microplacas (referido anteriormente). Utilizou-se elipticina como padrão. Os resultados foram expressos em valores de GI₅₀ (concentração de amostra responsável por 50% de inibição de crescimento celular).

3.6.2. Hepatotxicidade em células não tumorais

Preparou-se uma cultura de células primárias a partir de fígado fresco de porco, obtido num matadouro local, designada por PLP2 (*porcine liver primary cell culture*). O procedimento foi descrito anteriormente pelo grupo de investigação em que se insere este trabalho (Abreu *et al.*, 2011). Os tecidos foram lavados em solução salina de Hank contendo 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina e dividido em explantes de 1x1 mm³. Os explantes foram colocados em caixas de cultura com meio DMEM suplementado com SFB (10%), 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, e colocou-se na incubadora. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, monitorizando-se utilizando um microscópio invertido (Icon Eclipse Ts 100). As células foram transferidas para uma placa de 96 poços com uma densidade de 1×10^4 células/poço, e cultivadas em meio DMEM com 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina. As células foram tratadas com diferentes concentrações de amostra e efetuou-se o teste SRB descrito anteriormente. Utilizou-se elipticina como padrão. Os resultados foram expressos em valores de GI₅₀ (concentração de amostra responsável por 50% de inibição de crescimento celular).

3.7. Análise de compostos fenólicos

3.7.1. Ácidos fenólicos e flavonoides

A análise de compostos fenólicos foi efetuada por HPLC (Hewlett-Packard 1100, Agilent Technologies), com uma bomba quaternária, com dupla deteção *online* levada a cabo por um detetor de díodos (DAD) usando os comprimentos de onda de 280 nm e 370 nm preferenciais e um espectrómetro de massa (MS) (API 3200 Qtrap, Applied Biosystems) ligado ao sistema de HPLC (Guimarães *et al.*, 2013). Utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C18, 3 μm (4,6x150 mm) termostaticada a 35 °C. A fase móvel foi (A) ácido fórmico/água (0,1%) e (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição estabelecido foi isocrático 15% B até 5 min, 15-20% B até 5 min, 20-25% B mais 10 min, 25-35% B mais 10 min, 35-50% B mais 10 min e reequilíbrio da coluna; usou-se uma taxa de fluxo de 0.5 mL/min. A deteção MS foi realizada num API 3200 Qtrap (Applied Biosystems) equipado com uma fonte de ionização Electrospray (ESI) num analisador de massa de armadilha de ião-quadrupolo tripla, controlada pelo software Analyst 5.1. Usou-se ar de grau zero (30 psi) como gás de nebulização e gás turbo para secagem do solvente (400 °C, 40 psi). O azoto serviu como cortina (20 psi) e gás de colisão (médio). A tensão de *spray* dos iões foi definida a -4500V em modo negativo. O detetor MS foi programado para executar, em série, dois modos consecutivos: incrementar a análise do MS (EMS) e do ião produto (EPI). O sistema EMS foi utilizado para mostrar espetros de varrimento completo, para dar uma visão geral a todos os iões na amostra. As configurações usadas foram: potencial de não-cluster (DP) -45V, potencial de entrada (EP) -6V, energia de colisão (CE) -10V. Os espetros foram gravados em modo de ião negativo entre m/z 100 e 1500. O modo EPI foi executado, posteriormente, de modo a obter os padrões de fragmentação dos iões obtidos da experiência anterior, usando os seguintes parâmetros: DP -50V, EP -6V, CE -25V e espalhamento da energia de colisão (CES) 0V.

Os compostos fenólicos foram caracterizados de acordo com os seus espetros de UV e massa, e tempo de retenção em comparação com os padrões, quando disponíveis. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (2,5-100 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados foram expressos em mg por g de extrato/infusão/decoção.

3.7.2. Antocianinas

As amostras liofilizadas dos frutos (1 g) foram extraídas com 30 mL de metanol contendo TFA 0,5% e filtradas através de papel Whatman nº4. O resíduo foi então re-extraído duas vezes com 30 mL de TFA 0,5% em metanol. Os filtrados foram evaporados para remoção do etanol e re-dissolvidos em água. Para purificação, fez-se passar as soluções de extrato num cartucho C-18 SepPak[®] Vac 3 cc (Phenomenex), previamente ativado com metanol e, posteriormente, água; os açúcares e as substâncias mais polares foram removidos passando 15 mL de água e os pigmentos antocianos foram eluídos com 5 mL de metanol/água (80:20, v/v) contendo 0,1% de TFA. Os extratos foram concentrados, liofilizados, re-dissolvidos em 1 mL de metanol aquoso 20% e depois, filtrados através de discos LC descartáveis 0,22- μ m.

Os extratos purificados foram analisados através do sistema de HPLC descrito anteriormente, de acordo com o procedimento descrito por Garcia-Marino *et al.* (2010). A separação foi conseguida numa coluna C18 da AQUA[®] (Phenomenex) de fase reversa (5 μ m, 150 mm \times 4,6 mm i.d) termostaticada a 35 °C. Os solventes usados foram: (A) 0,1% TFA em água e (B) 100% acetonitrilo. O gradiente usado foi: isocrático 10% B até 3 min, 10 a 15% B mais 12 min, isocrático 15% B mais 5 min, 15 a 18% B mais 5 min, 18 a 30% B mais 20 min e 30 a 35% mais 5 min, a uma taxa de 0.5 mL/min. A deteção foi realizada através do DAD, usando 520 nm como comprimento de onda preferencial, e do equipamento de MS já descrito anteriormente. Usou-se ar de grau zero como gás nebulizador (40 psi) e gás turbo (600 °C) para secagem do solvente (50 psi). O azoto serviu como cortina (100 psi) e gás de colisão (alto). A energia de *spray* dos iões foi fixada nos 5000V em modo positivo. Os métodos EMS e ESI foram usados para aquisição de espectros de alta resolução e padrões de fragmentação dos iões percursores, respectivamente. Os parâmetros definidos para o modo EMS foram: DP 41V, EP 7.5V, CE 10V, e os parâmetros para o modo EPI foram: DP 41V; EP 7.5V, CE 10V e espalhamento da energia de colisão (CES) 0V.

As antocianinas presentes nas amostras foram caracterizadas de acordo com o seu espectro UV e de massa, e tempo de retenção por comparação com padrões, quando disponíveis. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (0,25-50 μ g/mL). Os resultados foram expressos em μ g por g de extrato.

3.8. Análise estatística

Para cada preparação (extrato metanol/água, infusão e decocção) foram utilizadas três amostras e todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos como valores médios \pm desvio padrão correspondentes (SD). Os resultados foram analisados por uma análise *one-way* de variância a (ANOVA) seguida de teste HSD Tukey's com $\alpha = 0,05$. No caso do valor nutricional, compostos hidrofílicos e lipofílicos, foi usado um teste *t*-student porque havia menos de três grupos de resultados. Este tratamento estatístico foi realizado pelo programa SPSS v. 20.0.

4. Resultados e Discussão

4.1. Caracterização química de frutos e pedúnculos de *P. avium*

4.1.1. Macronutrientes e compostos hidrofílicos

Os resultados da composição nutricional de frutos de *P. avium* (cereja doce), bem como a constituição dos frutos e pedúnculos em compostos hidrofílicos são apresentados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Caracterização de frutos de *P. avium* em macronutrientes, e de frutos e pedúnculos em compostos hidrofílico.

Macronutrientes nos frutos			
Humidade (g/100 g)	85,24 ± 2,52	Cinzas (g/100 g)	0,40 ± 0,10
Gordura (g/100 g)	0,04 ± 0,00	Hidratos de carbono (g/100 g)	13,90 ± 1,72
Proteína (g/100 g)	0,42 ± 0,01	Energia (kcal/100 g)	57,65 ± 6,85
Compostos hidrofílicos	Pedúnculos	Frutos	Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> -Student
Frutose	1,10 ± 0,05	5,47 ± 0,34	<0,001
Glucose	0,92 ± 0,05	6,02 ± 0,10	<0,001
Sorbitol	1,06 ± 0,05	1,62 ± 0,06	<0,001
Soma (g/100 g)	3,08 ± 0,06	13,85 ± 0,86	<0,001
Ácido oxálico	64,97 ± 0,75	29,61 ± 0,95	<0,001
Ácido málico	659,18 ± 0,68	715,78 ± 0,68	<0,001
Ácido ascórbico	nd	1,92 ± 0,11	-
Ácido xiquímico	1,96 ± 0,04	nd	-
Ácido cítrico	211,02 ± 0,62	6,53 ± 0,30	<0,001
Ácido fumárico	nd	0,37 ± 0,02	-
Soma (mg/100 g)	937,13 ± 0,85	754,21 ± 1,23	<0,001

Os resultados estão expressos em base de massa fresca (Média ± SD); nd- não detetado.

Os hidratos de carbono foram os macronutrientes mais abundantes, seguidos das proteínas. O teor de gordura foi baixo, e a contribuição energética foi ~ 58 kcal/100 g fw (massa fresca). Recentemente, Pacíficos *et al.* (2014) descreveram a composição química de frutos de *P. avium*, sendo os valores apresentados por estes autores muito semelhantes aos obtidos no presente estudo.

Os compostos hidrofílicos (açúcares livres e ácidos orgânicos) foram determinados nos frutos e pedúnculos. Os principais açúcares e derivados encontrados tanto nos frutos como nos pedúnculos foram a frutose, a glucose e o sorbitol (**Tabela 1**), sendo a glucose o mais abundante nos frutos, seguido de frutose, enquanto que nos pedúnculos todos os compostos foram encontrados em quantidades semelhantes. Não foram encontrados na literatura estudos sobre a composição química dos pedúnculos da cereja doce, enquanto que para os frutos existem inúmeros estudos (Usenik *et al.*, 2008, 2010; Serradilla *et al.*, 2011; Ballistreri *et al.*, 2013; Pacífico *et al.*, 2014). Os autores citados descrevem a presença dos mesmos açúcares, com valores semelhantes, embora alguns deles também tenham detetado a presença de sacarose (Usenik *et al.*, 2008, 2010; Pacífico *et al.*, 2014).

Nos frutos de *P. avium* analisados foram identificados e quantificados os seguintes ácidos orgânicos: ácidos oxálico, málico, ascórbico, cítrico e fumárico; já nos pedúnculos foram encontrados os ácidos oxálico, málico, cítrico e xiquímico (**Tabela 1**). O ácido málico foi o ácido orgânico mais abundante em ambas as partes, sendo apontado por outros autores como o principal ácido orgânico presente nos frutos (Usenik *et al.*, 2008, 2010; Serradilla *et al.*, 2011; Ballistreri *et al.*, 2013). Ao contrário do observado no presente estudo, os autores citados não descrevem a presença de ácido ascórbico, mas identificam o ácido xiquímico. Schmitz-Eiberger e Blanke (2012) foram os únicos autores a descrever a presença de ácido ascórbico nos frutos; no entanto, a quantidade encontrada por eles foi muito mais elevada do que a determinada neste trabalho, provavelmente, devido ao diferente estágio de maturação dos frutos analisados.

4.1.2. Compostos lipofílicos

Os resultados relativos à composição em ácidos gordos (FA) e tocoferóis (compostos lipofílicos) de frutos e pedúnculos de *P. avium*, são apresentados na **Tabela 2**.

Tabela 2. Caracterização de pedúnculos e frutos de *P. avium* em compostos lipofílicos.

	Pedúnculos	Frutos	Valor de <i>p</i> teste <i>t</i> -Student
C6:0	0,17 ± 0,00	0,07 ± 0,01	<0,001
C8:0	0,40 ± 0,00	0,12 ± 0,02	<0,001
C10:0	0,53 ± 0,03	0,17 ± 0,03	<0,001
C12:0	0,94 ± 0,02	0,70 ± 0,02	<0,001
C13:0	0,03 ± 0,00	tr	-
C14:0	1,86 ± 0,02	1,30 ± 0,01	<0,001
C14:1	tr	0,04 ± 0,00	<0,001
C15:0	0,75 ± 0,02	0,73 ± 0,01	0,212
C16:0	21,98 ± 0,40	22,27 ± 0,77	0,459
C16:1	0,82 ± 0,02	0,34 ± 0,07	<0,001
C17:0	1,20 ± 0,01	0,97 ± 0,02	<0,001
C18:0	8,39 ± 0,02	0,53 ± 0,04	<0,001
C18:1n9	18,61 ± 0,17	23,95 ± 0,54	<0,001
C18:2n6	17,64 ± 0,01	25,08 ± 0,07	<0,001
C18:3n3	16,83 ± 0,03	15,39 ± 0,20	<0,001
C20:0	2,95 ± 0,04	0,91 ± 0,02	<0,001
C20:1	0,11 ± 0,00	0,07 ± 0,01	<0,001
C20:3n3+C21:0	0,40 ± 0,03	0,14 ± 0,00	<0,001
C22:0	3,44 ± 0,20	0,64 ± 0,04	<0,001
C24:0	2,90 ± 0,10	0,58 ± 0,01	<0,001
SFA (percentagem)	45,58 ± 0,18	35,00 ± 0,73	<0,001
MUFA (percentagem)	19,55 ± 0,19	24,40 ± 0,46	<0,001
PUFA (percentagem)	34,87 ± 0,01	40,60 ± 0,28	<0,001
α-Tocoferol	512,58 ± 15,06	104,06 ± 9,39	<0,001
β-Tocoferol	31,94 ± 4,30	11,81 ± 2,09	<0,001
γ-Tocoferol	23,58 ± 1,08	nd	-
Soma (µg/100 g)	568,10 ± 18,28	115,87 ± 11,48	<0,001

Os resultados de ácidos gordos estão expressos em percentagem relativa; os resultados de tocoferóis estão expressos em base de massa fresca (Média ± SD); tr- quantidades vestigiais.

Ácido caproico (C6:0); Ácido caprílico (C8:0); Ácido cáprico (C10:0); Ácido láurico (C12:0); Ácido tridecanóico (C13:0); Ácido mirístico (C14:0); Ácido miristoleico (C14:1); Ácido pentadecanóico (C15:0); Ácido palmítico (C16:0); Ácido palmitoleico (C16:1); Ácido heptadecanóico (C17:0); Ácido esteárico (C18:0); Ácido oleico (C18:1n9c); Ácido linoleico (C18:2n6c); Ácido α-linolénico (C18:3n3); Ácido araquídico (C20:0); Ácido eicosenóico (C20:1c); Ácido *cis*-11,14,17-eicosatrienóico e Ácido heneicosanóico (C20:3n3 + C21:0); Ácido beénico (C22:0); Ácido lignocérico (C24:0).

Nos frutos, os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) predominaram, seguido dos ácidos gordos saturados (SFA), e com menor quantidade os ácidos gordos monoinsaturados (MUFA), enquanto nos pedúnculos os SFA predominaram sobre os PUFA e MUFA. Nos frutos, os FA determinados em percentagens mais elevadas foram o ácido linoleico (C18:2n6), o ácido oleico (C18:1n9), o ácido palmítico (C16:0) e o ácido α -linolénico (C18:3n3), enquanto nos pedúnculos a ordem de abundância foi C16:0, C18:1n9, C18:2n6 e C18:3n3.

Quanto aos tocoferóis, apenas o δ -tocoferol não foi detetado estando presentes todas as outras isoformas de tocoferóis; os pedúnculos revelaram a concentração mais elevada de tocoferóis. O α -tocoferol foi a isoforma mais abundante em ambas as partes, sendo mais abundante nos pedúnculos. Pelo que nos apercebemos não há registos de compostos lipofílicos em *P. avium*.

4.2. Bioatividade de diferentes preparações de frutos e pedúnculos de *P. avium*

4.2.1. Atividade antioxidante

A atividade antioxidante das diferentes preparações de pedúnculos (extratos metanol: água, infusões e decocções) e dos extratos metanol: água dos frutos de *P. avium* foi avaliada utilizando quatro ensaios *in vitro*. Os resultados são apresentados na **Tabela 3**.

Tabela 3. Propriedades bioativas de diferentes preparações obtidas a partir de pedúnculos e frutos de *P. avium*.

Amostras	Pedúnculos			Frutos
	Extratos	Infusões	Decocções	Extratos
Atividade antioxidante (valores de EC ₅₀ , mg/mL)				
Atividade captadora DPPH	0,36 ± 0,01 ^d	0,63 ± 0,01 ^c	0,54 ± 0,01 ^b	0,99 ± 0,01 ^a
Poder redutor	0,18 ± 0,02 ^d	0,44 ± 0,03 ^b	0,31 ± 0,01 ^c	0,57 ± 0,01 ^a
Inibição descoloração β -caroteno	0,30 ± 0,01 ^d	0,42 ± 0,06 ^b	0,35 ± 0,04 ^c	1,80 ± 0,04 ^a
Inibição TBARS	0,07 ± 0,00 ^d	0,24 ± 0,01 ^b	0,13 ± 0,01 ^c	1,46 ± 0,09 ^a
Atividade antitumoral (valores de GI ₅₀ , µg/mL)				
HCT-15 (carcinoma de cólon)	>400	>400	>400	73,51 ± 6,37
Hepatotoxicidade (valores de GI ₅₀ , µg/mL)				
PLP2	>400	>400	>400	>400

Valores de EC₅₀ (Média ± SD): Concentração de amostra correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor. Valores de EC₅₀ para o Trolox (controlo positivo): 41 µg/mL (poder redutor), 42 µg/mL (atividade captadora DPPH), 18 µg/mL (inibição da descoloração β-caroteno) e 23 µg/mL (inibição TBARS). Valores de GI₅₀ (Média ± SD) correspondem à concentração de amostra responsável por 50% de inibição do crescimento nas linhas celulares tumorais humanas ou na cultura primária de células de fígado- PLP2. Valores de GI₅₀ para a elipticina (controlo positivo): 1,42 µg/mL (HCT-15) e 2,06 µg/mL (PLP2). Em cada linha, letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Devido ao uso tradicional de infusões e decocções preparadas com pedúnculos de *P. avium*, nomeadamente como sedativos, diuréticos e drenantes (Hooman *et al.*, 2009; Di Cagno *et al.*, 2011), estas preparações foram obtidas, testadas e comparadas com os extratos metanol/água obtidos a partir quer de pedúnculos, quer de frutos.

O potencial antioxidante dos frutos de cereja doce foi previamente estudado por diferentes autores (Chaovanalikit e Wrolstad, 2004; Serra *et al.*, 2010, 2011a, 2011b; Schmitz-Eiberger e Blanke, 2012). No entanto, no presente estudo, todas as preparações obtidas utilizando pedúnculos revelaram maior potencial antioxidante do que o extrato metanol/água obtido a partir dos frutos. Em particular, o extrato de pedúnculos revelou a maior atividade antioxidante em todos os ensaios, seguido da sua decocção e da infusão. Este resultado está, provavelmente, relacionado com a maior concentração de

compostos fenólicos encontrados nos pedúnculos, em comparação com os frutos (**Tabelas 4 e 5**; secção 4.3).

4.2.2. Atividade antitumoral e hepatotoxicidade

Os resultados da atividade antitumoral e da citotoxicidade em células normais das diferentes preparações de pedúnculos (extratos metanol/água, infusões e decocções) e dos extratos metanol/água dos frutos de *P. avium* são também apresentados na **Tabela 3**.

Não se observou nenhuma atividade nas linhas celulares MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular) (até à concentração máxima testada, 400 µg/mL). O extrato metanol/água obtido a partir dos frutos foi o único a mostrar atividade, revelando seletividade contra HCT-15 (carcinoma do cólon) ($GI_{50} \sim 74$ µg/mL; **Tabela 3**). Este resultado pode estar relacionado com a presença de antocianinas que só foram encontrados em frutos e não em pedúnculos (**Tabela 5**; secção 4.3.). De facto, a citotoxicidade de frutos de *P. avium* para outras células cancerígenas do colón humano (HT29) já tinha sido previamente descrita (Serra *et al.*, 2010, 2011a, 2011b).

De salientar que nenhuma das preparações testadas apresentou hepatotoxicidade em culturas primárias de células de fígado (células não-tumorais) (**Tabela 3**; $GI_{50} > 400$ µg/mL para PLP2).

4.3. Análise de compostos fenólicos

Os perfis fenólicos de pedúnculos e frutos de *P. avium* (após extração metanol/água) foram registados a 280 e 370 nm, e apresentam-se nas **Figuras 6A e B**.

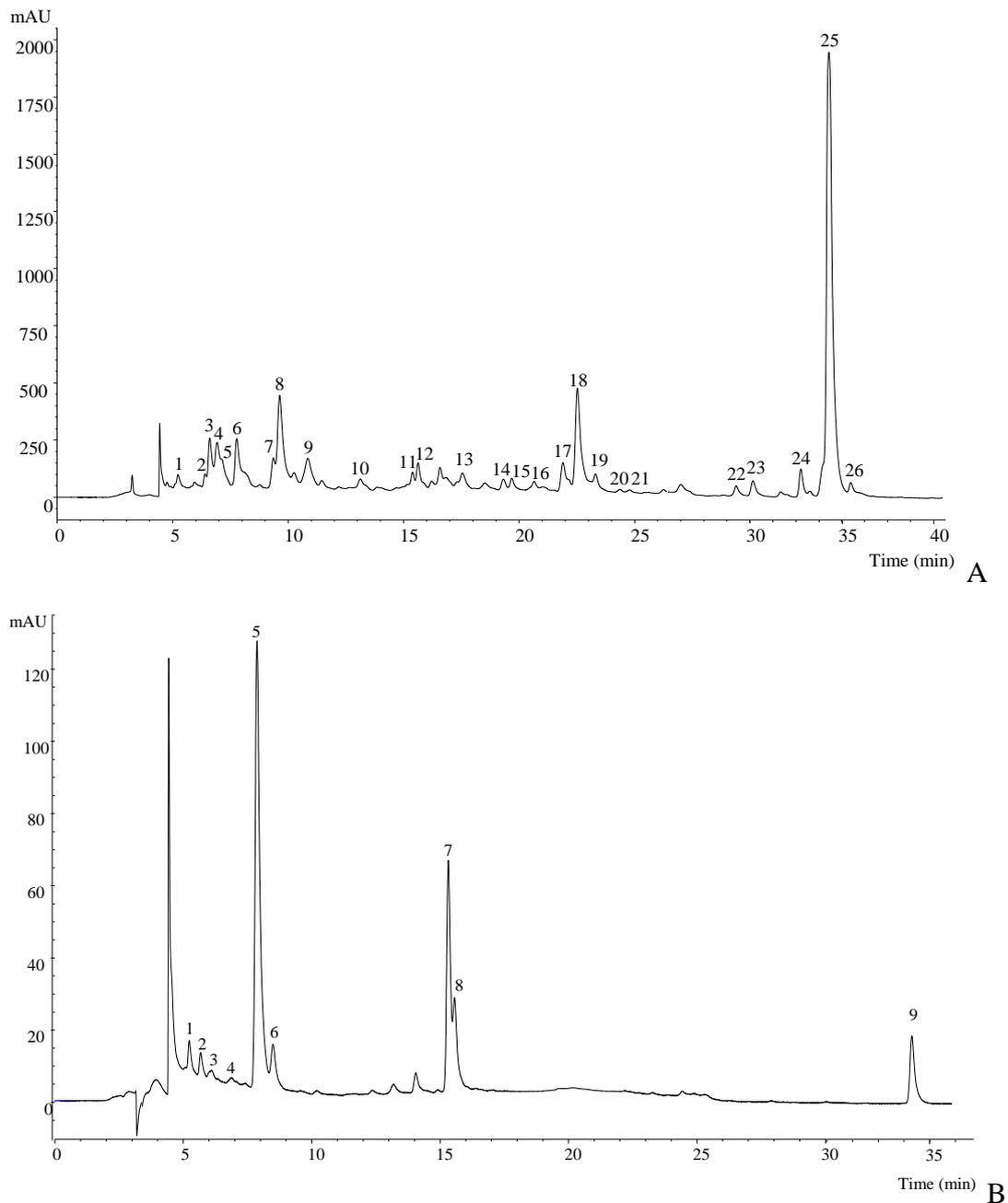


Figura 6. Perfis de compostos fenólicos no extrato metanol/água de pedúnculos de *P. avium* (registado a 280 nm) (**A**); extrato metanol/água de frutos de *P. avium* (registado a 370 nm) (**B**).

As características dos picos e as tentativas de identificação dos compostos presentes em pedúnculos e frutos são apresentadas nas **Tabelas 4 e 5**, respetivamente. Foram detetados vinte e seis compostos nos pedúnculos, sete dos quais são derivados de ácidos fenólicos e dezanove são derivados de flavonoides (**Tabela 4**). Nos frutos, foram detetados doze compostos (**Tabela 5**), três dos quais são derivados de ácidos fenólicos, três são antocianinas e os restantes seis são flavonoides.

Tabela 4. Tempos de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorvância máxima na região do visível (λ_{\max}), informação dos espectros de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos em pedúnculos de *P. avium*.

Pico	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	Ião molecular [M-H] ⁺ (m/z)	MS ² (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/g)		
						Extratos	Infusões	Decocções
1	5,2	328	353	191(100),179(60),173(5),135(50)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	0,43 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,01
2	6,4	326	341	179(100)	Ácido <i>cis</i> cafeico hexósido	0,17 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,12 ± 0,02
3	6,6	282,342sh	465	303(100)	Taxifolina-7- <i>O</i> -hexósido	0,79 ± 0,04	0,29 ± 0,01	0,19 ± 0,01
4	6,9	312	337	191(21),173(6),163(100),155(54)	Ácido <i>p</i> -cumaroilquínico	0,53 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01
5	7,1	322	341	179(100)	Ácido <i>trans</i> cafeico hexósido	0,49 ± 0,02	0,07 ± 0,01	0,09 ± 0,01
6	7,8	278	289	245(56), 203(19), 137(44)	Catequina	3,74 ± 0,01	0,42 ± 0,04	0,44 ± 0,05
7	9,4	312	223	-	Ácido sinápico	0,29 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,01
8	9,6	285,342sh	449	287(100)	Aromadendrina-7- <i>O</i> -hexósido	2,66 ± 0,07	1,22 ± 0,04	0,86 ± 0,02
9	10,9	312	325	163(100)	Ácido <i>p</i> -cumárico hexósido	0,68 ± 0,04	0,32 ± 0,02	0,25 ± 0,01
10	13,1	324	355	193(100)	Ácido ferúlico hexósido	0,30 ± 0,03	0,20 ± 0,01	0,17 ± 0,01
11	15,4	350	771	609(100),463(20),301(41)	Quercetina- <i>O</i> -rutinósido- <i>O</i> -hexósido	0,44 ± 0,01	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00
12	15,6	346	755	593(100),447(47),285(55)	Canferol- <i>O</i> -rutinósido- <i>O</i> -hexósido	0,55 ± 0,01	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01
13	17,5	286,334sh	449	287(100)	Aromadendrina- <i>O</i> -hexósido	0,31 ± 0,04	tr	tr
14	19,3	288,348sh	463	301(100),286(17)	Metil-aromadendrina- <i>O</i> -hexósido	0,06 ± 0,01	tr	tr
15	19,7	356	609	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido	0,87 ± 0,02	nd	nd
16	21,0	356	463	301(100)	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido	0,27 ± 0,02	nd	nd
17	21,9	256/330	431	269(100)	Genisteína-7- <i>O</i> -glucósido	0,55 ± 0,03	nd	nd
18	22,5	284,338sh	433	271(100)	Naringenina-7- <i>O</i> -glucósido	2,96 ± 0,02	0,14 ± 0,02	0,08 ± 0,01
19	23,3	352	593	285(100)	Canferol-3- <i>O</i> -rutinósido	0,88 ± 0,03	nd	nd

20	24,4	356	623	315(75),300(21)	Metil quercetina- <i>O</i> -rutinósido	0,15 ± 0,01	nd	nd	
21	24,8	352	447	285(100)	Canferol-3- <i>O</i> -glucósido	0,30 ± 0,01	nd	nd	
22	29,4	286,336sh	549	255(100)	Pinocembrina- <i>O</i> -pentosil-hexósido	0,23 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,03 ± 0,00	
23	30,1	290,340sh	579	285(90),270(14)	Di-hidrovgonina/sakuranetina- <i>O</i> -pentosil-hexósido	0,36 ± 0,01	tr	tr	
24	32,2	258/316	415	253(100)	Crisina-7- <i>O</i> -glucósido	0,50 ± 0,01	tr	tr	
25	33,4	286/346	447	285(85),270(100)	Di-hidrovgonina-7- <i>O</i> -glucósido/sakuranetina-5- <i>O</i> -glucósido	13,63 ± 0,05	8,49 ± 0,13	5,66 ± 0,05	
26	34,3	272/348	283	268(100)	Metil genisteína	0,31 ± 0,01	0,08 ± 0,02	0,03 ± 0,00	
						Ácidos fenólicos	2,90 ± 0,07 ^a	1,04 ± 0,04 ^b	0,98 ± 0,07 ^c
						Flavonoides	29,54 ± 0,10 ^a	10,83 ± 0,27 ^b	7,39 ± 0,12 ^c
						Total de compostos fenólicos	32,44 ± 0,17 ^a	11,88 ± 0,30 ^b	8,37 ± 0,19 ^c

nd-não detetado; tr- vestígios. Em cada linha, letras diferentes correspondem a valores estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

Tabela 5. Tempos de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorvância máxima na região do visível (λ_{\max}), informação dos espectros de massa, identificação e quantificação de compostos fenólicos em extratos metanol/água dos frutos de *P. avium*.

Pico	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	Ião molecular [M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Identificação	Quantificação (mg/g)	
1	5,2	328	353	191(100),179(66),173(9),161(10),135(62)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	0,83 ± 0,03	
2	5,7	278	451	289(20),245(5),137(100)	Catequina hexósido	1,68 ± 0,01	
3	6,9	312	337	191(68),173(8),163(100),155(3),119(59)	Ácido <i>cis p</i> -cumaroilquínico	0,56 ± 0,01	
4	7,1	310	337	191(51),173(8),163(100),155(5),119(40)	Ácido <i>trans p</i> -cumaroilquínico	0,23 ± 0,02	
5	7,9	342	611	303(13),285(76)	Taxifolina- <i>O</i> -desoxi-hexosil-hexósido	0,66 ± 0,01	
6	8,5	350	465	303(22),285(100)	Taxifolina- <i>O</i> -hexósido	0,13 ± 0,01	
7	15,3	350	771	609(100),463(25),301(42)	Quercetina- <i>O</i> -rutinósido- <i>O</i> -hexósido	0,42 ± 0,01	
8	15,6	268,sh342	443	271(20),253(75)	Naringenina- <i>O</i> -hexósido	0,17 ± 0,01	
9	33,4	288,sh346	447	285(92),270(22)	Di-hidrovogonina-7- <i>O</i> -glucósido/sakuranetina-5- <i>O</i> -glucósido	0,62 ± 0,01	
						Ácidos fenólicos	1,62 ± 0,05
						Flavonoides (não-antocianinas)	3,96 ± 0,04
						Total de compostos fenólicos	5,58 ± 0,09
Pico	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	Ião molecular [M+H] ⁺ (m/z)	MS ² (m/z)	Identificação	Quantificação (µg/g)	
10	18,2	512	449	287(100)	Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido	2,19 ± 0,27	
11	19,6	518	595	449(10),287(100)	Cianidina-3- <i>O</i> -rutinósido	14,50 ± 0,64	
12	25,5	524	609	463(8),301(100)	Peonidina-3- <i>O</i> -rutinósido	0,64 ± 0,01	
						Antocianinas	17,34 ± 0,91

4.3.1. Ácidos fenólicos

O ácido sinápico (composto 7 nos pedúnculos) foi positivamente identificado de acordo com o seu tempo de retenção, massa e características de UV-vis, por comparação com um padrão comercial. O composto 1 nos pedúnculos e frutos ($[M-H]^-$ a m/z 353) foi identificado como ácido 3-*O*-cafeoilquínico (ácido neoclorogénico), obtendo-se um pico de base a m/z 191, acompanhado por um ião secundário com fragmento a m/z 179 com >60% de abundância do pico de base, característico do ácido 3-*O*-acilclorogénico de acordo com o padrão de fragmentação descrito por Clifford *et al.*, (2003, 2005). O composto 4 (pedúnculos) e os compostos 3 e 4 (frutos), foram identificados como ácido 3-*p*-cumaroilquínico, obtendo-se o pico de base a m/z 191, como descrito por Clifford *et al.*, (2006). Além disso, no presente estudo foram identificados nos frutos os isómeros *cis* e *trans*. A atribuição foi feita com base na sua ordem relativa de eluição; como seria de esperar os derivados *cis* hidroxicinamoil eluíram antes que os correspondentes derivados *trans*, tal como observado após irradiação com UV (366 nm, 24 h) de ácidos hidroxicinâmicos no nosso laboratório (Barros *et al.*, 2012). Assim, o composto 4 (pedúnculos) e o composto 3 (frutos), foram identificados como ácidos *cis*-3-*p*-cumaroilquínicos. Os ácidos 3-*O*-cafeoilquínico e 3-*p*-cumaroilquínicos têm sido descritos em frutos de *P. avium* (Gonçalves *et al.*, 2004; Fazzari *et al.*, 2008; Usenik *et al.*, 2008, 2010; Gonzáles-Gómez, 2010; Jakobek *et al.*, 2009a,b; Liu *et al.*, 2011; Serra *et al.*, 2010,2011a e 2011b; Serradilla *et al.*, 2011; Ballistreri *et al.*, 2013; Pacífico *et al.*, 2014).

Nos pedúnculos, os compostos 2, 9 e 10 foram identificados como hexósidos do ácido cafeico, *p*-cumárico e ferúlico, com base nos respetivos iões fragmento libertados a m/z 179 [ácido cafeico- H] $^-$, 163 [cumárico- H] $^-$ e 193 [ácido ferúlico- H] $^-$, após a perda de um hexosilo (-162 mu). O composto 5 apresenta o mesmo ião pseudomolecular e espectros de UV e de fragmentação do composto 2 e, portanto, foram tentativamente identificados como ácido *trans* cafeico hexósido.

4.3.2. Flavonoides

Nos pedúnculos foram identificados positivamente por comparação com os padrões comerciais os seguintes flavonoides: catequina (composto 6), quercetina-3-*O*-rutinosídeo (composto 15), quercetina-3-*O*-glucósido (composto 16), canferol-3-*O*-rutinosídeo (composto 19), e canferol 3-*O*-glucósido (composto 21). Os restantes compostos foram

tentativamente identificados com base nos seus espectros de UV e massa, e estudos anteriores em *P. avium* quando disponíveis.

O composto 11 (nos pedúnculos) e 7 (nos frutos) apresentaram um espectro de UV característico de flavonóis (λ_{\max} a 350 nm) e um ião pseudomolecular $[M-H]^-$ para m/z 771, libertando três fragmentos de m/z 609 ($[M-162]^-$, perda de um hexosilo), 463 ($[M-162]^-$, perda de um desoxi-hexósido) e 301 [quercetina- H] $^-$ ($[M-162]^-$, perda de um hexosilo). Assim, o composto foi identificado como uma quercetina-*O*-rutinósido-*O*-hexósido. Do mesmo modo, o composto 12 em pedúnculos foi identificado como um canferol-*O*-rutinósido-*O*-hexósido. O substituinte desoxi-hexosil-hexósido nestes compostos pode ser associado à rutinose, devido à identificação positiva de quercetina e canferol-3-*O*-rutinósidos nos pedúnculos de *P. avium*. Tanto quanto sabemos, estes compostos não foram previamente identificados em *P. avium*.

O pico 20 tem características espectrais semelhantes ao composto 15 (rutina), mas com uma massa molecular superior em 15 u, o que evidencia um metilo quercetina-*O*-rutinósido.

As tentativas de identificação dos picos 17 (genisteína-7-*O*-glucósido), 18 (naringenina-7-*O*-glucósido, prunina) e 24 (crisina-7-*O*-glucósido) foram feitas tendo em conta a sua descrição anterior na casca de *P. avium* e *P. cerasus* (Hasegawa, 1957; Geibel *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1999). O composto 8 dos frutos apresentou o mesmo ião pseudomolecular ($[M-H]^-$ para m/z 433) que o composto 18 dos pedúnculos, libertando um fragmento a m/z 271 ($[M-naringenina]^-$). No entanto, este pico eluiu mais cedo do que o composto 18, não podendo ter a mesma identidade; portanto, foi tentativamente identificado como naringenina-*O*-hexósido.

Os compostos 25 (pedúnculos) e 9 (frutos) apresentaram um ião pseudomolecular $[M-H]^-$ a m/z 447 coincidente com o sakuranetina (sakuranetina-5-*O*-glucósido) ou di-hidroogonina-7-*O*-glucósido. A presença de sakuranetina em frutos de *P. avium* foi descrita anteriormente por Treutter *et al.* (1987) e Serra *et al.* (2011b e 2010), enquanto o di-hidroogonina-7-*O*-glucósido foi identificado como um componente principal no calo, floema e casca de *P. avium* (Treutter *et al.*, 1985; Geibel *et al.*, 1990). O facto deste pico ser o componente maioritário dos pedúnculos de *P. avium*, bem como a observação de que os 7-*O*-glucósidos são característicos de *P. avium*, enquanto que o 5-*O*-glucósido é mais típico de *P. cerasus* (Geibel *et al.*, 1990; Geibel e Feucht, 1991), suporta a identificação do di-hidroogonina-7-*O*-glucósido, em vez de sakuranetina; no entanto, não se pode ser conclusivo quanto à sua estrutura. O composto 23 dos

pedúnculos, com um ião pseudomolecular ($[M-H]^-$ a m/z 579), apresenta mais 132 u do que o composto 25, apesar do padrão de fragmentação semelhante. Assim, pode ser um derivado pentosil-hexósido de di-hidroavogonina ou sakuranetina.

Os compostos 3 (pedúnculos) e 6 (frutos) ($[M-H]^-$ a m/z 465) e os compostos 8 e 13 (pedúnculos) ($[M-H]^-$ a m/z 449), todos eles libertando um fragmento de iões a partir da perda de 162 u (hexosilo), podem ser designados como *O*-hexósidos dos di-hidroflavonóis taxifolina e aromadendrina, respetivamente. As agliconas já tinham sido descritas na madeira de *P. avium* (Hasegawa, 1957). Embora a natureza e a posição do açúcar não possa ser estabelecida, os compostos 3 e 8 (pedúnculos) podem especular-se como 7-*O*-glucósidos, de acordo com o já identificado em casca de *P. avium* (Geibel *et al.*, 1990; Geibel e Feucht, 1991). O composto 14, com características semelhantes ao composto 8 mas uma massa molecular 15 u superior, pareceu-nos corresponder a um metil-aromadendrina-*O*-hexósido. O composto 5 ($[M-H]^-$ a m/z 611) também apresentou um ião fragmento a m/z 303 ($[taxifolina-H]^-$; perda de desoxi-hexosil-hexósido, -308 u), sendo identificado tentativamente como taxifolina-*O*-desoxi-hexosil-hexósido.

O composto 22 (pedúnculos) apresentou um ião pseudomolecular $[M-H]^-$ a m/z 549, libertando um fragmento a m/z 255 ($[M-132-162]^-$), que pode ser associado à pinocembrina, uma flavanona descrita na madeira de diferentes espécies de *Prunus* (Hasegawa, 1957). Assim, o composto foi tentativamente identificado como pinocembrina-*O*-pentosil-hexósido.

Finalmente, o composto 26 dos pedúnculos apresentaram um ião pseudomolecular $[M-H]^-$ a m/z 283 libertando um ião fragmento a m/z 268 (perda de um grupo CH_3); que pode corresponder a uma genisteína metilada.

4.3.3. Antocianinas

O perfil de antocianinas obtido para os frutos de *P. avium* é apresentado no cromatograma da **Figura 7**. A identidade e a concentração dos três compostos detetados (cianidina-3-*O*-glucósido- composto 10, cianidina 3-*O*-rutinósido- composto 11 e peonidina-3-*O*-rutinósido- composto 12), são apresentadas na **Tabela 5**. A identificação foi efetuada por comparação das características de seus espectros de UV e massa com os dados da nossa biblioteca. A cianidina-3-*O*-rutinósido (composto 11) foi a antocianina mais abundante na amostra. As três antocianinas são as mais comunmente encontradas em frutos de *P. avium* (Gao e Mazza, 1995; Usenik *et al.*, 2008; Usenik *et al.*, 2010; Serradilla *et al.*, 2011; Ballistreri *et al.*, 2013).

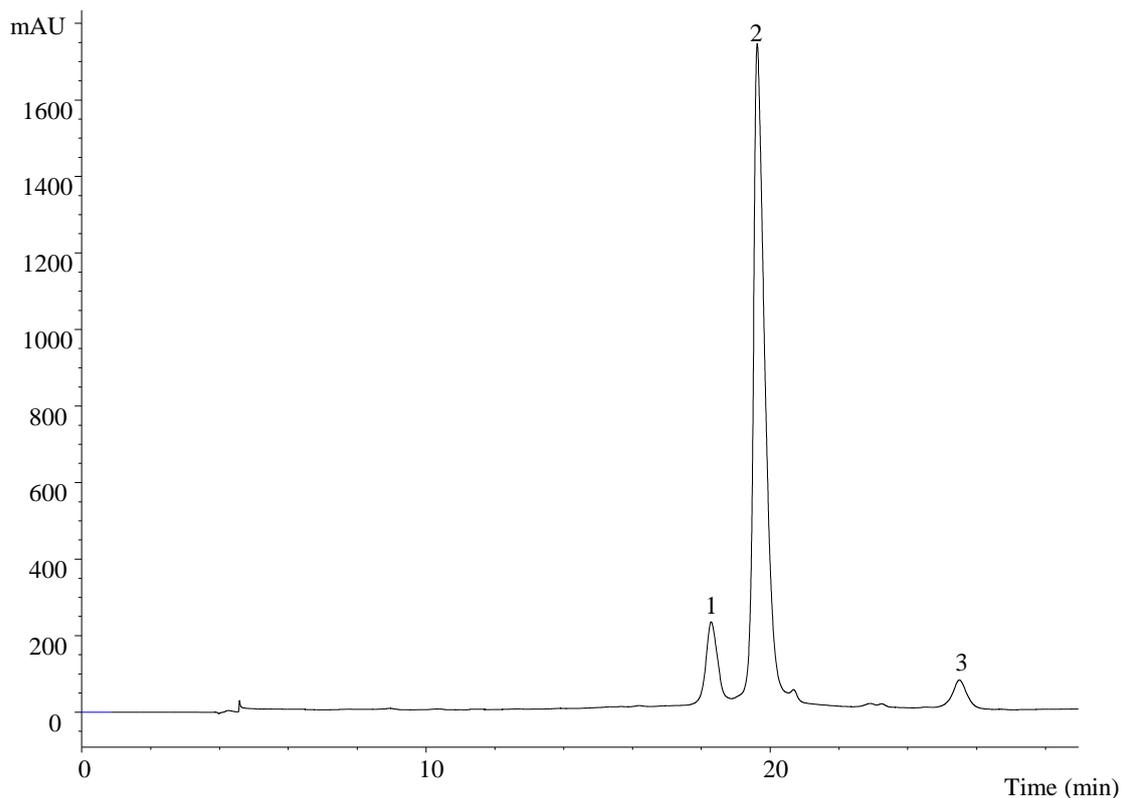


Figura 7. Perfil de antocianinas no extrato metanol/água dos frutos de *P. avium* (registrado a 520 nm).

Na literatura, existem vários estudos de identificação e quantificação de compostos fenólicos em frutos de *P. avium*, sendo vulgarmente descritos os seguintes compostos: ácidos fenólicos (ácidos neoclorogénico, clorogénico e *p*-cumaroilquínico), antocianinas (cianidina-3-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-rutínósido, peonidina-3-*O*-glucósido, peonidina-3-*O*-rutínósido e pelargonidina-3-*O*-rutínósido), flavonoides (rutina) e flavan-3-óis (catequina, epicatequina) (Gao e Mazza, 1995; Gonçalves *et al.*, 2004; Fazzari *et al.*, 2008; Usenik *et al.*, 2008; González-Gómez; Usenik *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2011; Serra *et al.*, 2010; Serradilla *et al.*, 2011; Ballistreri *et al.*, 2013; Pacífico *et al.*, 2014). Além disso, Usenik *et al.*, (2010) também descreveram alguns derivados de procianidina, enquanto que Serra *et al.* (2011a) identificaram quercetina-3-*O*-glucósido.

5. Conclusões

Neste estudo, pretendeu-se avaliar as propriedades nutricionais e bioativas de frutos e pedúnculos de *P. avium* (cereja doce).

Os hidratos de carbono foram os macronutrientes mais abundantes nos frutos que demonstraram também um baixo teor em gordura e valor calórico.

A glucose foi o açúcar mais abundante nos frutos, enquanto que os pedúnculos apresentaram quantidades semelhantes de glucose, frutose e sorbitol. Os frutos apresentaram ainda maior concentração total de açúcares livres. Pelo contrário, os pedúnculos revelaram maior teor total de ácidos orgânicos, com relevância para o ácido cítrico; a presença de ácido ascórbico só foi detetada nos frutos.

Nos frutos, os ácidos gordos polinsaturados predominaram (sobretudo ácido linoleico), enquanto nos pedúnculos os ácidos gordos saturados prevaleceram (especialmente ácido palmítico). Os pedúnculos revelaram uma concentração mais elevada de tocoferóis, sobretudo α -tocoferol que foi a isoforma mais abundante em ambas as partes.

Quanto à bioatividade das diferentes preparações obtidas a partir dos frutos (extrato metanol/água) e dos pedúnculos (infusões, decocções e extratos metanol/água); os pedúnculos revelaram maior potencial antioxidante, em especial o extrato metanol/água o que poderá estar relacionado com a sua maior concentração de compostos fenólicos (di-hidroavonina-7-*O*-glucósido/sakuranetina-5-*O*-glucósido foi o flavonoide maioritário nesta amostra).

Por outro lado, o extrato metanol/água obtido a partir dos frutos foi o único a mostrar atividade antitumoral, *in vitro*, revelando seletividade contra HCT-15 (linha celular humana de carcinoma do cólon). Este resultado pode estar relacionado com a presença de antocianinas que só foram encontrados em frutos e não em pedúnculos (cianidina-3-*O*-rutinosídeo foi a antocianina maioritária nesta amostra).

Deve salientar-se o facto de nenhuma das preparações testadas ter apresentado hepatotoxicidade em culturas primárias de células de fígado (células não-tumorais).

No geral, o presente estudo apresenta resultados inovadores em relação à caracterização química e às propriedades bioativas de pedúnculos de cereja doce. As suas infusões e decocções revelaram uma boa atividade antioxidante; por outro lado, o extrato metanol/água pode ser obtido para incorporação em produtos nutracêuticos ou farmacêuticos.

Os estudos relacionados com a alimentação, nutrição e saúde são muito interessantes. Efetivamente, o consumo de fruta e legumes tem sido associado a diferentes efeitos benéficos na saúde humana nomeadamente, na diminuição do risco de várias doenças crónicas, como o cancro. Assim, o estudo de matrizes vegetais como fonte de compostos bioativos é bastante pertinente, podendo servir de base científica para o desenvolvimento de novos projetos de investigação utilizando outras matrizes nomeadamente, tropicais.

Seria muito interessante aplicar as técnicas aprendidas durante este trabalho (cromatografia, espetrometria de massa e bioensaio) a espécies nativas do meu país de origem de forma a validar cientificamente o uso tradicional (maioritariamente para fins medicinais) das mesmas.

Referências bibliográficas

- Abreu, R.M.V., Ferreira, I.C.F.R., Calhella, R.C., Lima, R.T., Vasconcelos, M.H., Adega, F., Chaves, R., Queiroz, M.J.R.P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 5800-5806.
- Aggarwal, B.B., Shishodia, S. (2006). Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancers. *Biochemical pharmacology*, 71, 1397- 1421.
- Aherne S.A., O'Brein N.M. (2002). Dietary flavonols: chemistry, food content, and metabolism. *Nutrition*, 18, 75-81.
- Alves, C.Q., David, J.M., David, J.P., Bahia, M.V., Aguiar, R.M. (2010). Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova*, 33, 2202-2210.
- AOAC. (1995). Official methods of analysis (16th Ed.). Arlington VA, USA: Association of Official Analytical Chemists.
- Ballistreri, G., Continella, A., Gentile, A., Amenta, M., Fabroni, S., Rapisarda, P. (2013). Fruit quality and bioactive compounds relevant to human health of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars grown in Italy. *Food Chemistry*, 140, 630-638.
- Barbier, M., Thibault, J-F. (1982). Pectic Substances of Cherry Fruits. *Phytochemistry*, 21, 111-115.
- Bardon, S., Foussard, S., Fournel, V., Loubat, A.S. (2002). Monoterpenes inhibit proliferation of human colon cancer cells by modulating cell cycle-related protein expression. *Cancer Letters*, 181, 187-194.
- Barros, L., Carvalho, A.M., Morais, J.S., Ferreira, I.C.F.R. (2010a). Strawberry-tree, blackthorn and rose fruits: Detailed characterization in nutrients and phytochemicals with antioxidant properties. *Food Chemistry*, 120, 247-254.
- Barros, L., Dueñas, M., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R., Santos-Buelga, C. (2012). Characterization of phenolic compounds in flowers of wild medicinal plants from Northeastern Portugal. *Food and Chemical Toxicology*, 50, 1576-1582.
- Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2010b). Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: Vitamins and phenolics. *LWT- Food Science and Technology*, 43, 544-550.

- Basanta, M.F., Plá, M.F.E., Raffo, M.D., Stortz, C.A., Rojas, A.M. (2014). Cherry fibers isolated from harvest residues as valuable dietary fiber and functional food ingredients. *Journal of Food Engineering*, 126, 149-155.
- Beattie, J. Crozier, A. Duthie, G.G. (2005). Potential health benefits of berries, *Current Nutrition and Food Science*, 1, 71-86.
- Bejma, J., Ramires, P., Ji, L.L. (2000). Free radical generation and oxidative stress with ageing and exercise: differential effects in the myocardium and liver. *Acta Physiologica Scandinavica*, 169, 343 – 51.
- Belitz H.-D., Grosch, W., Schieberle, P. (2004). *Food Chemistry*. Third edition Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 1070 p.
- Block, G., Patterson, B., Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer*, 18, 1-29.
- Boland, F.E., Blomquist, V. (1965) – Chemical Composition of Red Sour Pitted and Sweet Cherries. *Journal of the Association of Official Analytical Chemists*, 48, 523-524.
- Bourne, L.C., Rice-Evans, C.A. (1999). Unitary detection of hydroxycinnamates and flavonoids in humans after high dietary intake of fruit. *Free Radical Research*, 28, 429-38.
- Brand-Miller, J., Foster-Powell, K. (1999). Dies with a low glycemic index: from theory to practice. *Nutrition Today*, 34, 64-72.
- Burke, Y., Ayoubi, A., Werner, S., McFarland, B.C., Heilman, D.K., Ruggeri, B.A., Crowell, P.L. (2002). Effects of the isoprenoids perillyl alcohol and farnesol on apoptosis biomarkers in pancreatic cancer chemoprevention. *Anticancer Research*, 22, 3127-3134.
- Cao, G., Prior, R.L. (1999). Anthocyanins are detected in human plasma after oral administration of an elderberry extract. *Clinical Chemistry*, 45, 574-576.
- Carocho, M., Ferreira, I.C.F.R. (2013). The Role of Phenolic Compounds in the Fight against Cancer- A Review. *Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry*, 13, 1236-1258.
- Chaovanalikit, A., Wrolstad, R.E. (2004). Total Anthocyanins and Total Phenolics of Fresh and Processed Cherries and Their Antioxidant Properties. *Journal of Food Science*, 69, FCT67–FCT72.
- Clifford, M.N., Zheng, W., Kuhnert, N. (2006). Profiling the chlorogenic acids of aster by HPLC–MSn. *Phytochemical Analysis*, 17, 384-393.

- Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., Kuhnert, N.A. (2003). A hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 2900-2911.
- Clifford, M.N., Knight, S., Kuhnert, N.A. (2005). Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 3821-3832.
- Constantinides, S.M., Bedford, C.L. (1964) – Sugars in Red Tart Cherries and their Changes during Maturation. *Journal of Food Science*, 29, 804-807.
- Croteau R., Kutchan, T.M., Lewis, N.G. (2000). Natural Products (Secondary Metabolites). In: *Biochemistry & Molecular Biology Of Plants*. Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L (eds), American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, USA, pp 1250-318.
- Crowell P.L., Siar, A.A., Burke, Y.D. (1996). Antitumorigenic effects of limone and perillyl alcohol against pancreatic and breast cancer. *Advances in Experimental Biology*, 401, 131-136.
- Crozier, A., Clifford, M.N., Ashihara, H. (2006). Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human diet; Blackwell Publishing: Oxford.
- De Candolle, A. (1883). *Origine des Plantes Cultivées*. Paris. (Bibliothèque Scientifique Internationale XLIII).
- Di Cagno, R., Surico, R.F., Minervini, G., Rizzello, C.G., Lovino, R., Servili, M., Taticchi, A., Urbani, S., Gobbetti, M. (2011). Exploitation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) puree added of stem infusion through fermentation by selected autochthonous lactic acid bacteria. *Food Microbiology*, 28, 900-909.
- Dias, M.I., Barros, L., Dueñas, M., Prereira, E., Carvalho, A.M., Alves, R.C., *et al.*, (2013). Chemical composition of wild and commercial *Achillea millefolium* L. and bioactivity of the methanolic extract, infusion and decoction. *Food Chemistry*, 141, 4152-4160.
- Drake, S.R. (1991). The Cherry. In N.A.M. Eskin (ed.), *Quality and Preservation of Fruits*. CRC Press, USA, 169-180.
- Duke, J. (1985). *Handbook of Medicinal Herbs*. CRC Press, Florida.
- Elegbede, J., Flores, R., Wang, C. (2003). Perillyl alcohol and peril aldehyde induced cell cycle arrest and cell death in BroTo and A549 cells cultured in vitro. *Life Sciences*, 73, 2831- 2840.

- Esti M., Cinquanta, L., Sinesio, F., Moneta, E., DiMatteo, M. (2002). Physiochemical and sensory fruit characteristics of two sweet cherry cultivars after cool storage. *Food Chemistry*, 76, 399-405.
- Fang, Y.Z, Yang, S., Wu, G. (2002). Free radicals, antioxidants, and nutrition. *Nutrition*, 18, 872-879.
- FAO. (2012). Organização para a Alimentação e Agricultura das Nações Unidas). FAO, Base de dados estatísticos.
- Fazzari, M., Fukumoto, L., Mazza, G., Livrea, M.A., Tesoriere, L., Di Marco, L. (2008). In vitro bioavailability of phenolic compounds from five cultivars of frozen sweet cherries (*Prunus avium* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56, 3561-3568.
- Ferreira, I.C.F.R., Abreu, R.M.V. (2007). Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. *Bioanálise*, Sociedade Portuguesa de BioAnalistas da Saúde, Ano IV, nº 2, Julho/Dezembro.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, 16, 1543-1560.
- Foo, J., Michor, F. (2010). Evolution of resistances to anti-cancer therapy during general dosing schedules. *Journal of Theoretical Biology*, 263, 179-188.
- Fraga, G.C. (2010). Plant phenolics and human health: Biochemistry, nutrition and pharmacology; John Wiley & Sons: *New Jersey*.
- Fu, S., Davies, M.J., Stocker, R., Dean, R.T. (1998). Evidence for roles of radicals in protein oxidation in advanced human atherosclerotic plaque. *Biochemistry Journal*, 333, 519-525.
- Gao L., Mazza, G. (1995). Characterization, quantification and distribution of anthocyanins and colorlessphenolics in sweet cherry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43, 343-6.
- García-Marino, M., Hernández-Hierro, J.M., Rivas-Gonzalo, J.C., Escribano-Bailón, M.T. (2010). Colour and pigment composition of red wines obtained from co-maceration of Tempranillo and Graciano varieties. *Analytica Chimica Acta*, 660, 134-142.
- Geibel, M., Feucht, W. (1991). Flavonoid 5-glucosides from *Prunus cerasus* bark and their characteristic weak glycosidic bond. *Phytochemistry*, 30, 1519-1521.
- Geibel, M., Geiger, H., Treutter, D. (1990). Tectochrysin 5- and genistein 5-glucosides from the bark of *Prunus cerasus*. *Phytochemistry*, 29, 1351-1353.

- Gilbert, D.L. (2000). Fifty years of radical ideas. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 1-14.
- Girard, B., Kopp, T.G. (1998). Physico chemical characteristics of selected sweet cherry cultivars. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 471-476.
- Gonçalves, B. (2006). *Ecofisiologia da cerejeira, composição fenólica e atividade antioxidante dos frutos*. Dissertação de doutoramento, UTAD, Vila Real, 201p.
- Gonçalves, B., Landbo, A.-K., Knudsen, D., Silva, A.P., Moutinho-Pereira, J., Rosa, E., Meyer, A.S. (2004). Effect of ripeness and postharvest storage on the phenolic profiles of cherries (*Prunus avium* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 523-530.
- Gonçalves, B., Moutinho-Pereira, J., Santos, A., Bacelar, E., Correia, C., Cavalheiro, J., Silva, A.P. (2007). Qualidade da cereja e seus reflexos na saúde humana. *Revista da Associação Portuguesa de Horticultura*, 90, 14-19.
- Gonçalves, B., Moutinho-Pereira, J., Santos, A., Silva, A.P., Bacelar, E., Correia, C., Rosa, E. (2006). Scion-rootstock interaction affects the physiology and fruit quality of sweet cherry tree. *Tree Physiology*, 26, 93-104.
- Gonçalves, B., Silva, A.P. (2008). Valor nutricional da cereja. Efeitos na saúde. Em Cerejais. A árvore e o fruto. Santos, A.S.A ed.
- González-Gómez, D., Lozano, M., Fernández-León, M.F., Bernalte, M.J., Ayuso, M.C., Rodríguez, A.B. (2010). Sweet cherry phytochemicals: Identification and characterization by HPLC-DAD/ESI-MS in six sweet-cherry cultivars grown in Valle del Jerte (Spain). *Journal of Food Composition and Analysis*, 23, 533-539.
- Gordaliza, M. (2007). Natural products as leads to anticancer drugs. *Clinical and Translational Oncology*, 9, 767-776.
- Greenwald, P., Milner, J., Anderson, D., McDonald, S. (2002). Micronutrients in cancer chemoprevention. *Cancer Metastasis Reviews*, 21, 217-230.
- Guimarães, R., Barros L., Duenas, M., Calhella, R.C., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Queiroz, R.P.M.J., Ferreira, I.C.F.R. (2013). Infusion and decoction of wild German chamomile: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. *Food Chemistry*, 136, 947-954.
- Gutteridge, J.M, Halliwell, B. (2000). Free radicals and antioxidants in the year. A historical look to the future. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 899, 136-147.

- Haeseler, G., Misselhorn, K. (1966). Determination of sorbitol and mannitol in cherry pulps. *Zeitschrift für Lebensmittel-Untersuchung*, 129, 71-75.
- Halliwell B. (1996). Antioxidants in human health and disease. *Annual Review of Nutrition*, 16, 33-50.
- Halliwell, B. (1990). How to characterize a biological antioxidant. *Free Radical Research Communication*, 9, 1-32.
- Halliwell, B., Gutteridge, J.M. (1984). Free radicals, lipid peroxidation, and cell damage. *Lancet*, 324, 1055-1110.
- Hasegawa, M. (1957). Flavonoids of Various Prunus Species. VI. The Flavonoids in the Wood of *Prunus aequinoctialis*, *P. nipponica*, *P. maximowiczii* and *P. avium*. *Journal of the American Chemical Society*, 79, 1738-1740.
- Henley, K., Benaksas, E.J, Bolli, R., Comp, P, Grammas, P, Hamdheydari, L., Mou, S., Pye, Q.N., Stoddard, M.F., Wallis, G., Williamson, K.S., West, M., Wechter, W.J., Floyd, R.A. (2004). New perspectives on vitamin E: gamma-tocopherol and carboxyethylhydroxychroman metabolites in biology and medicine. *Free Radical Biology & Medicine*, 36, 1-15.
- Herrmann K. (1989). Occurrence and content of hydroxycinnamic and hydroxybenzoic acid compounds in foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28, 315-47.
- Hertog, M.G.L., Hollman, P.C.H. (1996). Potential health effects of the dietary flavonolquercetin. *European Journal of Clinical Nutrition*, 50, 63-71.
- Hooman, N., Mojab, F., Nickavar, B., Pouryousefi-Kermani, P. (2009). Diuretic effect of powdered *Cerasus avium* (cherry) tails on healthy volunteers. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Science*, 22, 381-383.
- Jacobs, M.B. (1951). *The Chemistry and Technology of Foods and Food Products*, vol. II. Interscience, New York.
- Jacquim. P. (1965). La vitamine C dans la cerise. *Annual Technology Agriculture*, 14, 157-165.
- Jakobek, L., Seruga, M., Seruga, B., Novak, I., Medvidovic-Kosanovic, M. (2009). Phenolic compound composition and antioxidant activity of fruits of *Rubus* and *Prunus* species from Croatia. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 860-868.

- Jakobek, L., Seruga, M., Voca, S., Sindrak, Z., Dobricevic, N. (2009). Flavonol and phenolic acid composition of sweet cherries (cv. Lapins) produced on six different vegetative rootstocks. *Scientia Horticulturae*, 123, 23-28.
- Jemal, A., Bray, F., Center, M.M., Ferlay, J., Ward, F., Forman, D. (2011). Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 61, 69-90.
- Johansen, J.S., Harris, A.K., Rychly, Ergul, A.D. (2005). Oxidative stress and the use of antioxidants in diabetes: linking basic science to clinical practice. *Cardiovascular Diabetology*, 4, 1-11.
- Kang, S.-Y., Seeram, N.P., Nair, M.G., Bourquin, L.D. (2003). Cereja antocianinas inibem o desenvolvimento de tumours em ratos ApcMir e reduz a proliferação de células cancerígenas do cólon humano. *Cancer Letters*, 194, 13-19.
- Kanter, M. (1998). Free radical, exercise and antioxidante supplementation. *Proceedings of The Nutrition Society*, 57, 9-13.
- Kertsz, Z.I. (1951). *The Pectic Substances*. Interscience Publishers, Inc., New York.
- Kim D.O., H.J. Heo, Y.J. Kim, H.S. Yang, C.Y. Lee. (2005). Sweet and sour cherry phenolics and their protective effects on neuronal cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 9921-9927.
- Kris-Etherton, P.M., Hecker, K.D., Bonanome, A., Coval, S. M., Binkoski, A.E., Hilpert, K.F., Griel, A. E., Etherton, T.D. (2002). Bioactive Compounds in foods: their role in the prevention of cardiovascular disease and cancer. *The American Journal of Medicine*, 113, 71-88.
- Lichou, J., Edin, M., Tronel, C., Saunier, R. (1990). *Le Ceresier "La cerise de table"*. Ctifl, Paris. XII, 361 p.
- Liu, R.H. (2003). Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 78, S517-S520.
- Liu, Y., Liu, X., Zhong, F., Tian, R., Zhang, K., Zhang, X., Li, T. (2011). Comparative study of phenolic compounds and antioxidant activity in different species of cherries. *Journal of Food Science*, 76, C633-C638.
- Looney N.E. (1996). Principle and Practice of Bioregulator Usage. In: *Cherries: Crop Physiology, Production and Uses*. Webster, A.D. e Looney, N.E. (eds.), CAB International, Wallingford, UK, 279-295 p.
- Lule, S.U., Xia, W. (2005). Food phenolics, pros and cons: A review. *Food Reviews International*, 21, 367-288.

- Macheix J.-J., Fleuriet, A., Billot, J. (1990). *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Raton, FL, 378 p.
- Mariette, S., Tavaud, M., Arunyawat, U., Capdeville, G., Millan, M., Salin, F. (2010). Population structure and genetic bottleneck in sweet cherry estimated with SSRs and the gametophytic self-incompatibility locus. *BMC Genetics*, 11, 77-80.
- Martínez- Flórez S., Gonzáles-Gallego, J., Culebras, J.M., Muñón, M.J. (2002). Los flavonoides: propiedades y acciones antioxidantes. *Nutrición Hospitalaria*, 17, 271-278.
- McCune, L.M., Kubota, C., Stendell-Hollis, N.R., Thomson, C.A. (2011). Cherries and health: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 51, 1-12.
- Messina (2005). A healthy look at sweet cherries. Washington State Fruit Commission Washington.
- Mota, M.P., Figueiredo, P., Duarte, J.A. (2004). Teorias biológicas do envelhecimento. *Revista Portuguesa de Ciências do Desporto*, 4, 81-110.
- Mozetic B., Simcic M., Trebse, P. (2006). Anthocynins and hydroxycinnamic acids of Lambert Compact cherries (*Prunus avium* L.) after cold storage and 1-methylcyclopropene treatment. *Food Chemistry*, 97, 302-309.
- Mozetic, B., Trebse, P., Hribar, J. (2002). Determination and quantification of anthocyanins and hydroxycinnamic acids in different cultivars of sweet cherries (*Prunus avium* L.) from Nova Gorica Region (Slovenia). *Food Technology and Biotechnology*, 40, 207-12.
- Pacifico, S., Di Maro, A., Petriccione, M., Galasso, S., Piccolella, S., Di Giuseppe, A.M.A., Scortichini, M., Monaco, P. (2014). Chemical composition, nutritional value and antioxidante properties of autochthonous *Prunus avium* cultivars from campania region. *Food Research International*, 64, 188-199.
- Pastore, A., Federici G., Bertini, E., Piemonte, F. (2003). Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. *Clinica Chimica Acta*, 333, 19- 39.
- Pereira, C., Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2013). Use of UFLC-PDA for the analysis of organic acids in thirty-five species of food and medicinal plants. *Food Analytical Methods*, 6, 1337-1344.
- Pillow P.C., Duphorne, C.M., Chang, S., Contois, S., Contois, J.H., Strom, S.S., Spitz, M.R., Hursting, S.D. (1999). Developement of a database for assessing dietary psytoestrogen intake. *Nutrition and Cancer*, 33, 3-19.
- Quer, P.F. (1995). El Discórides renovado. 15.ªedition. Editorial Labor, Barcelona.

- Radtke J., Linseisen J., Wolfram, G. (1998). Phenolic acid intake of adults in a Bavarian subgroup of the national food consumption survey. *Zeitschrift für Ernährungswissenschaft*, 37, 190-197.
- Rajesh, D., Stenzel, R., Howad, S. (2003). Perillyl alcohol as a radio-/ chemosensitizer in malignant glioma, *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 35968-35978.
- Rice-Evans, C.A., Packer, L. (1998). *Flavonoids in Health and Disease*. M. Dekker, Inc. (ed.), New York, 20, 447-467.
- Ridnour, L.A., Isenberg, J.S., Espey, M.G., Thomas, D.D., Roberts, D.D., Wink, D.A. (2005). Nitric oxide regulates angiogenesis through a functional switch involving thrombospondin. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 102, 13147-13152.
- Rocha, A.B., Lopes, R.M., Schwartzman, G. (2001). Natural products in anticancer therapy. *Current Opinion in Pharmacology*, 1, 364-369.
- Roriz, C.L., Barros, L., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I.C.F.R. (2014). *Pterospartum tridentatum*, *Gomphrena globosa* and *Cymbopogon citratus*: A phytochemical study focused on antioxidant compounds. *Food Research International*, 62, 684-693.
- Salunkhe, D.K., Bolin, H.R, Reddy, N.R. (1991). Storage, processing and nutritional quality of fruit and vegetables. CRC Press, Boca Raton, 115-26.
- Samaila, D., Toy, B.J., Wang, R.C., Elegbede, J.A. (2004). Monoterpenes enhanced the sensitivity of head and neck cancer cells to radiation treatment *in vitro*. *Anticancer Research*, 24, 3089-3095.
- Sambuy, Y., Angelis, I., Ranaldi, G., Scarino, M.L., Stamatii, A., Zucco F. (2005). The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. *Cell Biology and Toxicology*, 21, 1-26.
- Samman, S., Lyons-Wall, P.M., Cook, N.C., Naghii, M.R. (1996). Minor dietary factors in relation to coronary heart disease-flavonoids, isoflavones and boron. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 20, 173-180.
- Schmitz-Eiberger, M.A., Blanke, M.M. (2012). Bioactive components in forced sweet cherry fruit (*Prunus avium* L.), antioxidative capacity and allergenic potential as dependent on cultivation under cover. *LWT - Food Science and Technology*, 46, 388-392.

- Schottenfeld, D., Jr, J.F.F. (2006). *Cancer epidemiology and prevention* 3rd ed.; Oxford University Press: New York.
- Serra, A.T., Matias, A.A., Almeida, A.P.C., Bronze, M.R., Alves, P.M.; Sousa, H.C., Duarte, C.M.M. (2011b). Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 2. Evaluation of SCF extracts as promising natural chemotherapeutical agentes. *Journal of Supercritical Fluids*, 55, 1007-1013.
- Serra, A.T., Duarte, R.O., Bronze, M.R., Duarte, C.M.M. (2011a). Identification of bioactive response in traditional cherries from Portugal. *Food Chemistry*, 125, 318-325.
- Serra, A.T., Seabra, I.J., Braga, M.E.M., Bronze, M.R., De Sousa, H.C., Duarte, C.M.M. (2010). Processing cherries (*Prunus avium*) using supercritical fluid technology. Part 1: Recovery of extract fractions rich in bioactive compounds. *Journal of Supercritical Fluids*, 55, 184-191.
- Serradilla, M.J., Lozano, M., Bernalte, M.J., Ayuso, M.C., López-Corrales, M., González-Gómez, D. (2011). Physicochemical and bioactive properties evolution during ripening of Ambrunés sweet cherry cultivar. *LWT- Food Science and Technology*, 44, 199-205.
- Serrano M., Guillen, F., Martinez-Romero, D., Castillo, S., Valero, D. (2005). Chemical constituents and antioxidant activity of sweet cherry at different ripening stages. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 2741-2745.
- Silva M.L.M.M.A., Alarcão, A. (1999). Caraterísticas físico-químicas e utilização agro-alimentares da cereja e da ginja. *Revista de Ciências Agrárias - Vol. XXIII - N°3*.
- Sorg O. (2004). Oxidative stress: a theoretical modelor a biological reality? *Comptes Rendus Biologies*, 327, 649-662.
- Treutter, D., Feucht, W., Schmid, P.P.S. (1987). Ageing dependent responses of phloem flavonoids of *Prunus avium* graftings: flavanone-, flavone-and isoflavone-glucosides. *Scientia Horticulturae*, 32, 183-193.
- Treutter, D., Galensa, R., Feucht, W., Schmid, P.P.S. (1985) Flavanone glucosides in callus and phloem of *Prunus avium*: Identification and stimulation of their synthesis. *Physiologia Plantarum*, 65, 95-101.
- USDA. (2005). National Nutrient Database for Standard Referente, Release 18.
- Usenik, V., Fabcic, J., Stampar, F. (2008). Sugar, organic acids, phenolic composition and antioxidant activity of sweet cherry (*Prunus avium* L.). *Food Chemistry*, 107, 185-192.

- Usenik, V., Fajt, N., Mikulic-Petkovsek, M., Slatnar, A., Stampar, F., Veberic, R. (2010). Sweet cherry pomological and biochemical characteristics influenced by rootstock. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58, 4928-4933.
- Valko, M., Leibfritz, D., Moncol, J., Cronin, M.T., Mazur, M., Telser, J. (2007). Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 39, 44-84.
- Velioglu, Y.S., Mazza, G., Gao, L., Oomah, B.D. (1998). Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 4113-4117.
- Volpe, S.L., Taper, L.J., Meacham, S. (1993). The relationship between boron and magnesium status and bone mineral density in the human: a review. *Magnesium Research*, 6, 291-296.
- Wang, H., Nair, M.G., Strasburg, G.M., Booren, A.M., Gray, I. (1999). Antioxidant polyphenols from tart cherries (*Prunus cerasus*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47, 840-844.
- Wiencke, J.K. (2004). Impact of race/ethnicity on molecular pathways in human cancer. *Nature Reviews Cancer*, 4, 79-84.
- Willett, W.C. (1994). Diet and health: what should we eat? *Science*, 264, 532-537.
- Winton, A.L., Winton, K.B. (1935). The Structure and Composition of Foods. Vol .II Vegetables, Legumes, Fruits. John Wiley e Sons, Inc., New-York.
- Yi, W., Wu, X., Cao, R., Song, H., Ma, L. (2009). Biological evaluations of novel vitamin C esters as mushroom tyrosinase inhibitors and antioxidants. *Food Chemistry*, 117, 381-386.
- Yilmaz, Y., Toledo, R.T. (2004). Health aspects of functional grape seed constituents. *Trends in Food Science & Technology*, 15, 422-433.
- Yuri, T., Danbara, N., Tsujita-Kyutoku, M., Kiyozuka, Y., Senzaki, H., Shikata, N., Kanzaki, H., Tsubura, A. (2004). Perillyl alcohol inhibits human breast cancer cell growth in vitro and in vivo. *Breast Cancer Research and Treatment*, 84, 251-260.
- Ziegler, R.G., Hoover, R.N., Pike, M.C., Hildesheim, A., Nomura, A.M., West, D.W., Wu-Williams, A.H., Kolonel, L.N., Horn-Ross, P.L., Rosenthal, J.F., Hyer, M.B. (1993). Migration patterns and breast cancer risk in Asian-American women. *Journal of the National Cancer Institute*, 85, 1819-27.

Anexos

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