



**ipb**

**INSTITUTO POLITÉCNICO  
DE BRAGANÇA**



**VNIVERSIDAD  
D SALAMANCA**  
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

**Desenvolvimento de hidrogéis à base de extratos de  
*Crataegus monogyna* Jacq.: caracterização química e bioatividade dos  
extratos e formulações finais**

Sandra Cristina Pinto Rodrigues

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança e à Universidade de Salamanca  
para obtenção do Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais*

**Orientação**

Isabel Cristina Fernandes Rodrigues Ferreira

Ana Maria Carvalho

João Carlos Martins Barreira

**Bragança**

Outubro 2013

*“Qualquer coisa que possa fazer, ou sonha  
que possa fazer, comece a fazê-la. A ousadia tem  
em si genialidade, força e magia.”*

***Faust, Goethe, 1749-1832***

## **Agradecimentos**

A realização deste trabalho, só foi possível com a colaboração de algumas pessoas a quem deixo aqui o meu agradecimento:

À Professora Doutora Isabel Ferreira, à Professora Doutora Ana Carvalho e ao Doutor João Barreira pela orientação, disponibilidade e paciência.

À Doutora Lillian Barros pelo apoio e ajuda que sempre me disponibilizou.

Ao Doutor Ricardo Calhela por toda a paciência, compreensão, ajuda e ensinamentos transmitidos.

Aos meus pais e à minha irmã por todo o apoio, carinho e incentivo para a realização deste trabalho.

A todos os meus amigos pelo apoio e amizade que direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

## Resumo

As plantas são cada vez mais procuradas como alternativa aos fármacos convencionais. O espinheiro (*Crataegus monogyna* Jacq.), tem sido bastante estudado pelas suas características etnofarmacológicas documentadas desde há muito tempo. Havendo já resultados promissores sobre o efeito antioxidante de extratos de diferentes partes de *C. monogyna*, era credível que a sua incorporação em formulações farmacêuticas poderia permitir o desenvolvimento de produtos com grande potencial.

A pele, sendo uma barreira entre o meio exterior e interior, está continuamente exposta ao stresse oxidativo. Para reparar eventuais danos, são necessários antioxidantes, que podem ser obtidos de forma endógena ou exógena. As formulações semi-sólidas (géis) de aplicação tópica constituem uma forma eficaz de fornecer compostos antioxidantes à pele. Neste trabalho, foram preparados hidrogéis livres de parabenos, usando carbopol 940 como agente gelificante. Os extratos obtidos a partir de diferentes partes de *C. monogyna*, incorporados nestes hidrogéis, bem como as formulações finais, foram avaliados quanto à sua atividade antioxidante. As partes de *C. monogyna* com maior bioatividade foram as flores e os frutos imaturos, enquanto os extratos etanólicos se apresentaram mais bioativos que os aquosos. Os hidrogéis apresentaram uma consistência adequada, uma textura não gordurosa e uma cor agradável; a sua atividade antioxidante foi quase totalmente mantida em relação aos extratos a partir dos quais foram preparados. Tendo sido testados na pele, os hidrogéis foram prontamente absorvidos e não apresentaram alterações significativas de pH durante 90 dias.

Foi também avaliada a capacidade de inibição do crescimento de células tumorais em quatro linhas celulares humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (adenocarcinoma de pulmão), Hela (carcinoma do colo do útero) e HepG2 (carcinoma hepatocelular). Os extratos de botões florais apresentaram a maior atividade antiproliferativa, como indicado pelos menores valores de  $GI_{50}$  obtidos para todas as linhas celulares. Para a avaliação da toxicidade dos extratos em células não tumorais, utilizou-se uma cultura primária (PLP2) obtida a partir de fígado de porco. Estes extratos foram caracterizados por HPLC-DAD-ESI/MS, verificando-se que os

flavonóides, especialmente flavonóis e flavonas (maior quantidade nos botões florais) e as procianidinas (maior quantidade nos frutos imaturos) foram as classes maioritárias.

Os ácidos fenólicos também foram detetados em quantidades significativas, principalmente nos extratos florais. Os frutos maduros apresentaram uma maior quantidade de antocianinas.

Em suma, o material vegetal estudado, obtido a partir do espinheiro, revelou bons índices de bioatividade, quer antioxidante, quer antiproliferativa, e os seus extratos demonstraram ser adequados para incorporar em géis hidrossolúveis de aplicação dérmica. Estes géis apresentaram características físicas e bioativas que comprovam a sua qualidade e potencial para aplicações dermatológicas.

## Abstract

Plants have been increasingly sought as an alternative to conventional drugs. Hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.), has been extensively studied for its previously documented ethnopharmacological benefits. The promising results on the antioxidant effect of extracts of different parts of *C. monogyna*, raised the possibility of its incorporation in pharmaceutical formulations to develop products with great potential.

As a protective barrier between the exterior and interior milieu, the skin is continuously exposed to oxidative stress. To repair any damage, endogenous or exogenous antioxidants are needed. Semisolid formulations (gels) are topically applied to effectively provide antioxidants to the skin. In this work, hydrogels were prepared without parabens, using carbopol 940 as jellifying agent. The extracts incorporated into these hydrogels, as well as the final formulations, were evaluated for their antioxidant activity. The parts of *C. monogyna* with higher bioactivity were flowers and immature fruits, while ethanol extracts showed to be more bioactive than the aqueous. The hydrogels had a suitable consistency, non-greasy texture and a pleasing color. Their antioxidant activity was almost completely maintained in comparison to the extracts from which they were prepared. Having been tested on the skin, the hydrogels were readily absorbed and showed no significant changes in pH during 90 days.

The ability to inhibit the growth of tumor cells was also assessed in four human cell lines: MCF-7 (breast adenocarcinoma), NCI-H460 (lung adenocarcinoma), Hela (cervical carcinoma) and HepG2 (hepatocellular carcinoma). Buds extracts gave the highest antiproliferative activity, as indicated by the lower GI<sub>50</sub> values obtained for all cell lines. To evaluate the toxicity of the extracts in non-tumor cells, a primary culture (PLP2) was obtained from pig liver. These extracts were characterized by HPLC-DAD-ESI/MS, being verified that flavonoids, especially flavonols and flavones (higher in flower buds) and procyanidins (higher in immature fruits) were the major classes. Phenolic acids were also detected in significant amounts, especially in floral extracts. Ripe fruits had the highest anthocyanins amount.

Briefly, the botanical parts of hawthorn showed good bioactivity (antioxidant and antiproliferative) and their extracts have shown to be appropriate to incorporate in water-soluble gels for dermal application. These gels showed physical and bioactive characteristics that prove their quality and potential for dermatological applications.

## Índice geral

Agradecimentos	i
Resumo	ii
Abstract	iv
Índice de figuras	viii
Índice de tabelas	ix
Abreviaturas	x
I. Introdução	1
1.1. Potencial medicinal de plantas: caso particular de <i>Crataegus monogyna</i>	1
1.2. Stresse oxidativo e antioxidantes	4
1.3. Relação entre envelhecimento e stresse oxidativo	7
1.4. O cancro, uma doença crónica frequentemente relacionada com o stresse oxidativo	9
1.5. Avaliação de propriedades antioxidantes	11
1.5.1. Ensaio da capacidade de captação de radicais DPPH	12
1.5.2. Ensaio do poder redutor	13
1.5.3. Ensaio da inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno	13
1.5.4. Ensaio das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)	14
1.5.5. Determinação do teor em fenóis: reagente de <i>Folin-Ciocalteu</i>	15
1.6. Avaliação do potencial antitumoral	15
1.7. Potencialidades dos fitonutrientes presentes em <i>Crataegus monogyna</i>	16
1.7.1. Compostos fenólicos	17
1.7.2. Flavonóides	18
1.8. Objetivos	20
II. Material e métodos	21
2.1. Padrões e reagentes	21
2.2. Amostras	21
2.3. Preparação das amostras: extratos e géis hidrossolúveis	23
2.4. Avaliação da atividade antioxidante	24
2.4.1. Atividade captadora de radicais DPPH	24
2.4.2. Poder redutor	25
2.4.3. Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno	25
2.4.4. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)	26
2.5. Determinação do teor em fenóis e flavonóides totais	26
2.6. Avaliação da atividade inibitória do crescimento de linhas celulares tumorais humanas	27
2.7. Avaliação da atividade inibitória do crescimento de células não tumorais	28
2.8. Caracterização química dos extratos fenólicos	29
2.8.1. Análise de compostos fenólicos não-antociânicos	29

2.8.2. Análise de antocianinas	30
2.9. Análise estatística	31
III. Resultados e discussão	32
3.1. Atividade antioxidante dos extratos etanólicos e aquosos e dos géis preparados com esses extratos	32
3.2. Atividade inibidora do crescimento de linhas celulares tumorais e não-tumorais exercida pelos extratos fenólicos	38
3.3. Caracterização química dos extratos fenólicos	40
3.3.1. Ácidos fenólicos e derivados	47
3.3.2. Flavonóis	49
3.3.3. Flavonas	50
3.3.4. Flavan-3-óis	51
3.3.5. Antocianinas	51
IV. Conclusões e perspectivas	53
V. Bibliografia	56
VI. Anexos	65

## Índice de figuras

<b>Figura 1.</b> Visão geral das principais reações envolvendo espécies reativas de oxigénio (ROS)/espécies reativas de azoto (RNS), e das principais defesas antioxidantes endógenas, enzimáticas e não-enzimáticas, da célula	4
<b>Figura 2.</b> Principais causas para a sobre-produção de radicais livres (stresse oxidativo), potenciais alvos celulares e consequências do stresse oxidativo	5
<b>Figura 3.</b> Antioxidantes naturais separados em classes. A verde: antioxidantes exógenos; a castanho: antioxidantes endógenos	6
<b>Figura 4.</b> Redução do radical DPPH	12
<b>Figura 5.</b> Reação de MDA e TBA na formação de TBARS	14
<b>Figura 6.</b> Estrutura base dos flavonóides	18
<b>Figura 7.</b> Estrutura química dos flavonóis	18
<b>Figura 8.</b> Estrutura química geral dos flavan-3-óis	19
<b>Figura 9.</b> Estrutura base de uma antocianina	19
<b>Figura 10.</b> Diferentes partes de <i>Crataegus monogyna</i> usadas neste trabalho	22
<b>Figura 11.</b> Extratos isolados e respetivos géis	23
<b>Figura 12.</b> Correlação entre a atividade captadora de radicais livres (DPPH) e o conteúdo em fenóis totais	34
<b>Figura 13.</b> Atividade antioxidante de frutos imaturos de <i>C. monogyna</i> em extratos etanólicos e aquosos. Comparação com o valor obtido para cada gel hidrossolúvel (incorporado com 100 µg/mL de extrato)	35
<b>Figura 14.</b> Conteúdo em fenóis e flavonóides totais nos preparados de géis hidrossolúveis (com incorporação de 100 µg/mL) e nos extratos isolados (100 µg/mL)	37
<b>Figura 15.</b> Cromatogramas de HPLC dos compostos fenólicos dos botões florais (A) e dos frutos imaturos (B) de <i>C. monogyna</i> , registados a 280 nm	41

## Índice de tabelas

<b>Tabela 1.</b> Atividade antioxidante ( $EC_{50}$ em $\mu\text{g/mL}$ ), teor em fenóis (mg GAE/g) e flavonóides (mg CE/g) totais dos extratos preparados a partir de diferentes partes de <i>C. monogyna</i>	33
<b>Tabela 2.</b> Atividade antioxidante dos géis hidrossolúveis (com incorporação de extrato a 100 $\mu\text{g/mL}$ ) e dos extratos (100 $\mu\text{g/mL}$ ) de diferentes partes de <i>C. monogyna</i>	36
<b>Tabela 3.</b> Atividade inibidora do crescimento de linhas celulares tumorais e não-tumorais exercida pelos extratos fenólicos de <i>C. monogyna</i>	39
<b>Tabela 4.</b> Parâmetros cromatográficos do perfil em compostos fenólicos dos extratos de botões florais de <i>C. monogyna</i> . Rt- tempo de retenção; $\lambda_{\text{max}}$ - comprimento de onda de absorção máxima	42
<b>Tabela 5.</b> Parâmetros cromatográficos do perfil em compostos fenólicos de extratos de frutos de <i>C. monogyna</i> . Rt- tempo de retenção; $\lambda_{\text{max}}$ - comprimento de onda de absorção máxima	44
<b>Tabela 6.</b> Parâmetros cromatográficos do perfil em antocianinas de extratos de frutos de <i>C. monogyna</i> . Rt- tempo de retenção; $\lambda_{\text{max}}$ - comprimento de onda de absorção máxima	46
<b>Tabela 7.</b> Correlações entre compostos fenólicos, flavonóides, ácidos fenólicos, flavanóis, flavonóis e procianidinas e valores $GI_{50}$	52

## Abreviaturas

Abs	Absorvância
CE	Equivalentes de catequina
CTE	Cadeia transportadora de electrões
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-Difenil-1-picril-hidrazilo
Dw	Massa seca
EC <sub>50</sub>	Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor
FC	<i>Folin-Ciocalteu</i>
FBS	Soro Fetal Bovino
GAE	Equivalentes de ácido gálico
HeLa	Linha celular humana de carcinoma cervical
HepG2	Linha celular humana de carcinoma hepatocelular
HPLC-DAD/ESI-MS	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detetor de díodos e espectrometria de massa
L <sup>•</sup>	Radical lipídico
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
LO <sup>•</sup>	Radical alcóxido
LOO <sup>•</sup>	Radical peróxido
LOOH	Hidroperóxido lipídico
MCF-7	Linha celular humana de carcinoma de mama
MDA	Malondialdeído
MDA-TBA	Complexo malondialdeído-ácido tiobarbitúrico
NCI-H460	Linha celular humana de carcinoma de pulmão
NO <sup>•</sup>	Radical óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PNS	Produtos naturais para a saúde
RNS	Espécies reativas de azoto
ROS	Espécies reativas de oxigénio
RSS	Espécies reativas de enxofre
Rt	Tempo de retenção
SOD	Superóxido dismutase
SRB	Sulforrodamina B
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
UV	Radiação ultravioleta
$\lambda_{\max}$	Comprimento de onda de absorção máxima

## I. Introdução

### 1.1. Potencial medicinal de plantas: caso particular de *Crataegus monogyna*

O uso de medicamentos tradicionais à base de plantas é sustentado num conhecimento que foi passado oralmente de geração em geração (Neves et al., 2009); efetivamente, as plantas têm sido usadas desde a Antiguidade como fonte de alimentos, de produtos cosméticos e de medicamentos (Roger, 2002). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população humana ainda trata os seus problemas de saúde com remédios tradicionais baseando-se principalmente na fitoterapia (Novais, et al., 2004).

Nos últimos 20 anos, mais de 60% dos novos fármacos para o tratamento do cancro e de 75% dos novos fármacos utilizados no tratamento de doenças infecciosas, são de origem natural. Adicionalmente, mais de 25% dos medicamentos prescritos são derivados de plantas, o que evidencia o enorme potencial destes recursos naturais. Por outro lado, apenas cerca de 1% dos medicamentos utilizados na medicina tradicional foram cientificamente avaliados. Na maioria dos países europeus, as plantas medicinais e os fitoterápicos são tratados como fármacos e aparecem integrados com medicamentos convencionais; são vendidos em farmácias, como medicamentos licenciados que estão disponíveis com ou sem receita médica. Esta situação é semelhante na China, onde os produtos registados podem ser encontrados em farmácias, como medicamentos prescritos ou de acesso livre. Na América do Norte, no entanto, os produtos naturais para a saúde (PNS) são considerados como alimentos e suplementos dietéticos e, portanto, vendidos em lojas de alimentos saudáveis. Em Portugal nas áreas rurais nomeadamente, na região nordeste, a medicina popular e as práticas tradicionais, coexistem muitas vezes com sistemas de medicina formalizados e institucionalizados (Barros et al., 2010).

Entre os PNS mais importantes, estão os dirigidos a tratamento de doenças cardiovasculares, que representam mais de 25% das vendas de fitoterápicos na União Europeia. Na América do Norte e no Canadá, em particular, os PNS utilizados no tratamento de problemas cardíacos também são considerados os mais importantes. Estes produtos incluem, por exemplo, tinturas, comprimidos, chás e extratos aquosos de

folhas, flores e frutos de diferentes espécies de *Crataegus*, disponíveis na Europa, Ásia e América do Norte (Shipley et al., 2012).

Tradicionalmente, as formulações/preparações farmacêuticas incluíam produtos derivados de plantas, sob a forma de partes da planta, extratos totais ou misturas. Na atualidade, têm sido desenvolvidos vários fármacos a partir de plantas que são ativos contra diferentes doenças (Haneefa et al., 2010).

Isto pode estar relacionado com o facto das plantas serem uma fonte particularmente boa de compostos bioativos, nomeadamente com propriedades antioxidantes. O grupo de investigação em que se insere este trabalho já estudou extratos alcoólicos e/ou aquosos de várias plantas silvestres do Nordeste de Portugal, pertencentes a diferentes famílias botânicas e com vários usos etnomedicinais conhecidos, tais como Rosaceae (*Crataegus monogyna* Jacq., *Prunus spinosa*, *Rosa canina*) (Barros et al., 2010a, 2011), Lamiaceae (*Glechoma hederaceae*, *Mentha* spp., *Origanum vulgare*, *Thymus mastichina*) (Barros et al., 2010b; Guimarães et al., 2011), Apiaceae (*Foeniculum vulgare*) (Guimarães et al., 2011), Ericaceae (*Arbutus unedo*) (Barros et al., 2010a), Malvaceae (*Malva sylvestris*) (Barros et al., 2010c) e Verbenaceae (*Aloysia citrodora*) (Guimarães et al., 2011). De todas as espécies e partes de plantas analisadas, os extratos metanólicos obtidos a partir de frutos imaturos de *C. monogyna* apresentaram a maior atividade antioxidante (valores de EC<sub>50</sub> inferiores a 25 µg/mL) (Barros et al., 2011).

A planta *C. monogyna* (vulgarmente designada por espinheiro, pilriteiro, escaramunheiro ou escarambunheiro) pertence à família Rosaceae; é um arbusto espinhoso que atinge entre 2 e 4 metros de altura; as folhas são caducas, divididas em 3 ou 5 lóbulos; as flores são brancas e aromáticas; os frutos são bagas de cor vermelha e designam-se por pomos; é muito comum nos bosques caducifólios e perenifólios (Roger, 2002). A composição química das flores e dos frutos foi já estudada pelo grupo de investigação em que se insere este trabalho. As flores apresentaram uma maior quantidade de tocoferóis e ácido ascórbico e uma melhor relação em ácidos gordos n-6/n-3; em contrapartida, os frutos maduros apresentaram os maiores níveis de hidratos de carbono totais, açúcares livres e ácidos gordos saturados; os frutos imaturos apresentaram o maior conteúdo em ácidos gordos polinsaturados e maior atividade antioxidante (superior ao padrão trolox) (Barros et al., 2011).

A atividade antioxidante de frutos e verduras tem sido frequentemente associada à concentração de diferentes antioxidantes, nomeadamente compostos fenólicos, ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol,  $\beta$ -caroteno e glutatona (Pennington & Fisher, 2009). Foram já publicados estudos sobre a presença de compostos fenólicos em flores e frutos de espinheiro (Froehlicher et al., 2009; Liu et al., 2010; Barros et al., 2011; Liu et al., 2011; Barros et al., 2012).

Além dos compostos referidos, foram também encontradas em *C. monogyna* concentrações consideráveis de ácido ascórbico, tocoferóis,  $\beta$ -caroteno, ácidos gordos saturados (ácidos hexadecanóico e tricosanóico) e polinsaturados (ácidos (9Z, 12Z)-octadeca-9,12-dienóico e (9Z, 12Z, 15Z)-octadeca-9,12,15-trienóico) (Barros et al., 2011).

A espécie *C. monogyna* é das mais recomendadas na medicina tradicional portuguesa, sendo considerada de particular importância na prevenção e controlo de doenças relacionadas com o envelhecimento (por exemplo, doenças cardiovasculares, aterosclerose, artrite e hipertensão), distúrbios do sistema nervoso (nomeadamente, enxaqueca, confusão, irritabilidade e perda de memória) e no tratamento de infeções respiratórias superiores, celulite, obesidade e distúrbios da menopausa (Camejo-Rodrigues et al., 2003; Novais et al., 2004; Neves et al., 2009; Carvalho, 2010).

As bagas eram em geral consumidas por pastores, caçadores e crianças, por serem consideradas saudáveis e nutritivas. Além disso, o sumo dos frutos é descrito como uma preparação tópica para aplicação na pele, que alivia a dor e rigidez muscular (Carvalho, 2010).

A pele é uma importante barreira protetora, sendo altamente exposta ao stresse oxidativo a partir de fontes exógenas ou endógenas (Portugal et al., 2007; Masaki, 2010). As fontes exógenas incluem fatores ambientais, como poluentes do ar, radiação ionizante e não-ionizante (Kohen & Nyska, 2002), enquanto as fontes endógenas consistem na formação de espécies reativas, nomeadamente de oxigénio, a partir de fagócitos ativados e enzimas (Rieger & Pains, 1993). A administração por via oral e dérmica de antioxidantes naturais, tais como a superóxido dismutase (SOD), o ácido ferúlico e os flavonóides podem proteger a pele contra a atividade oxidativa da radiação ultravioleta (Graf, 1992; Montenegro et al., 1995).

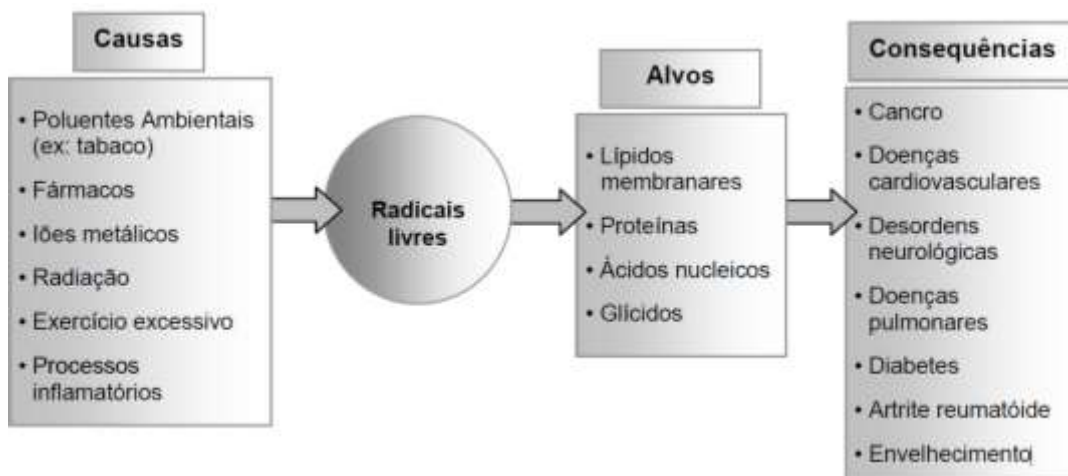


Um exemplo de RNS é o radical óxido nítrico (NO<sup>\*</sup>) que é gerado pela sintase do óxido nítrico (NOS) (Fig. 1). As RSS são facilmente formadas por reação de tióis com ROS (Carocho & Ferreira, 2013)

Os radicais livres são produzidos através do metabolismo normal e natural das células aeróbias, principalmente na forma de espécies reativas de oxigénio (ROS). Uma vez produzidos, a maior parte dos radicais livres é neutralizada por defesas antioxidantes celulares (enzimáticas e não enzimáticas). A manutenção do equilíbrio entre a produção de radicais livres e as defesas antioxidantes é uma condição essencial para o normal funcionamento do organismo (Ferreira et al., 2009).

O equilíbrio entre a produção de ROS e as defesas antioxidantes pode ser alterado, quer pela produção excessiva de ROS, quer pela perda das defesas antioxidantes celulares; este desequilíbrio é conhecido como stresse oxidativo e, neste caso, o excesso de ROS pode oxidar e danificar lípidos, proteínas celulares e DNA, levando a modificações estruturais com consequências a nível funcional.

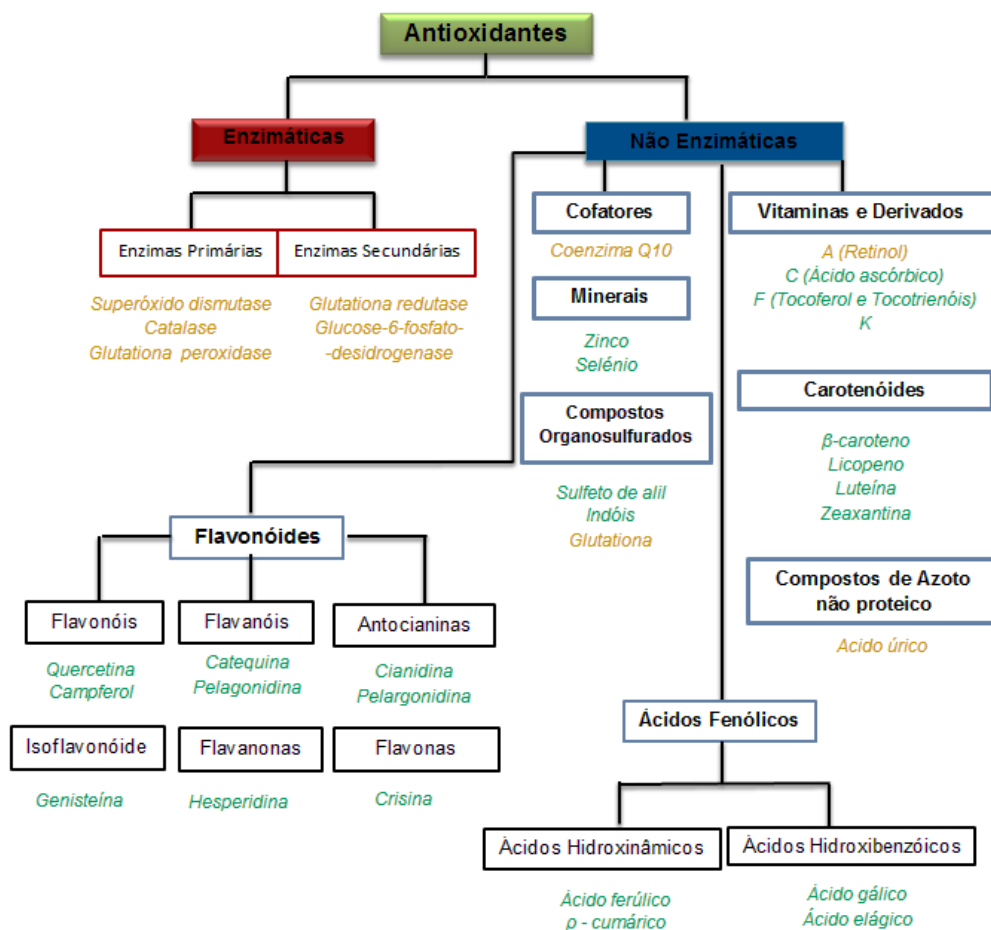
O stresse oxidativo pode ter diversas causas naturais nomeadamente, exercício extremo e processos de inflamação, mas também não naturais, tais como a presença de xenobióticos no organismo (Fig. 2). De facto, a produção descontrolada de radicais livres tem sido relacionada com mais de uma centena de doenças, incluindo vários tipos de cancro, diabetes, cirrose, doenças cardiovasculares, desordens neurológicas, entre outras. O excesso de produção de ROS também tem sido relacionado com o envelhecimento (Ferreira et al, 2009).



**Figura 2.** Principais causas para a sobre-produção de radicais livres (stresse oxidativo), potenciais alvos celulares e consequências do stresse oxidativo (Ferreira et al., 2009).

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em baixas concentrações em relação às concentrações do substrato oxidável, atrasam ou inibem, significativamente, a oxidação desse substrato. Do ponto de vista funcional, os antioxidantes podem ser classificados em antioxidantes de prevenção, de neutralização (*scavenging*) e de reparação. A função de prevenção de um antioxidante funciona como a primeira linha de defesa, conduzindo à supressão de ROS e RNS. Os antioxidantes de neutralização removem rapidamente espécies reativas antes que estas possam atacar moléculas biologicamente essenciais. Várias enzimas funcionam como terceira linha de defesa, na reparação dos danos, eliminando os resíduos e reconstituindo a função biológica danificada (Niki, 2010).

Para além das defesas enzimáticas já mencionadas que constituem o nosso sistema endógeno de defesas antioxidantes, existem vários antioxidantes naturais (Fig. 3), muitos identificados em plantas (fitoquímicos), que podem ser fornecidos ao organismo exogenamente e auxiliar o sistema endógeno no combate ao stress oxidativo.



**Figura 3.** Antioxidantes naturais separados em classes. A verde: antioxidantes exógenos; a castanho: antioxidantes endógenos (Carocho & Ferreira, 2013).

Na eliminação de radicais livres os antioxidantes estão em locais diferentes, alguns em ambiente intracelular e outros em ambiente extracelular, ou ainda no domínio aquoso ou lipofílico. Em qualquer dos locais, os antioxidantes trabalham de forma cooperativa. Alguns antioxidantes inibem a oxidação de moléculas biológicas através da interação direta com outros antioxidantes. Tal interação pode resultar na antioxidação sinérgica, e não simplesmente aditiva. A interação mais eficaz é a ação antioxidante sinérgica pela vitamina E e vitamina C. Quando a vitamina E elimina os radicais livres ativos, esta é convertida na sua forma radical, que pode atacar lípidos polinsaturados e induzir oxidação em cadeia. Foi demonstrado que, na ausência de vitamina C, a vitamina E aumenta a oxidação da LDL (lipoproteína de baixa densidade) isolada e de lípidos no plasma por meio da fase de transferência e dos mecanismos de transferência da cadeia, mas a combinação de vitaminas E e C inibem completamente a sua oxidação (Niki, 2010).

Para uma melhor compreensão da dinâmica da ação antioxidante, é importante seguir a sua utilização durante a oxidação. Quando mais de dois antioxidantes estão presentes, a ordem da sua utilização, que muitas vezes reflete a importância relativa dos antioxidantes, é determinada principalmente pelas características químicas, tais como o potencial redox e a energia de dissociação (Niki, 2010).

### **1.3. Relação entre envelhecimento e stresse oxidativo**

O envelhecimento é um processo biológico inevitável que afeta a maioria dos organismos vivos. É um processo genético e fisiológico associado a alterações morfológicas e funcionais dos componentes celulares e extracelulares, agravado por lesões e intensificado ao longo da vida, resultando num desequilíbrio progressivo dos sistemas de controlo dos reguladores do organismo, incluindo os sistemas hormonal, autócrino, neuroendócrino e imunitário, bem como diversos mecanismos homeostáticos (Kaur et al., 2007). A interação entre os radicais livres e os antioxidantes está relacionada de forma significativa com o processo de envelhecimento (Carocho & Ferreira, 2013).

Um caso particular de exposição ao stress oxidativo é o da pele. A pele é o maior órgão corporal, representando cerca de 15% da massa total do corpo. Exposta ao ambiente exterior, constitui a primeira linha de defesa do organismo, sendo também afetada por alterações que possam ocorrer no ambiente interno. Este órgão é mais suscetível aos danos oxidativos devido à presença de alvos biológicos para as reações envolvidas. A pele divide-se em três camadas: a epiderme, a derme e o tecido subcutâneo. Para além da sua importância como barreira protetora, a pele tem bastante importância a nível estético. A aparência da pele humana é potencialmente influenciada pelo balanço ou o equilíbrio entre duas ações importantes: a taxa de crescimento e a taxa de degradação (Phipps et al., 2010).

O combate contra o envelhecimento tornou-se um foco de marketing fundamental para o cuidado da pele nos últimos anos. Os cosméticos são utilizados como agentes funcionais em produtos para melhorar a aparência da pele, retardar, parar ou mesmo inverter os danos. É comum que esses produtos de aplicação tópica possuam antioxidantes. A aplicação regular de produtos de cuidados da pele que contêm antioxidantes pode ser de grande utilidade na sua proteção contra agressões exógenas que ocorrem durante a vida. Os antioxidantes de baixa massa molar protegem a pele contra o stress oxidativo e, portanto, é desejável incluir esses agentes de prevenção em formulações de aplicação direta. Embora os antioxidantes possam ser fornecidos à pele pela via da dieta e suplementação oral, os processos fisiológicos relacionados com a absorção, o transporte e a solubilidade limitam a quantidade que pode ser distribuída na pele. A aplicação direta tem a vantagem de poder atuar diretamente na zona que necessita de proteção (Kaur et al., 2007).

De facto, há evidências de que aplicações tópicas de compostos com propriedades captadoras (*scavenging*) de radicais livres em pacientes, protegem realmente os tecidos dos danos oxidativos (Meenakshi et al., 2006). Por outro lado, a utilização de plantas medicinais em produtos dermatológicos e cosméticos tem vindo a aumentar. Os efeitos colaterais provenientes da sua utilização são muito menores quando comparados com os efeitos causados por produtos sintéticos. No entanto, as formulações à base de plantas exigem métodos de padronização de forma a garantir a sua qualidade, segurança e eficácia. Tem sido feita uma extensa investigação relacionada com a identificação e caracterização de efeitos farmacológicos e tóxicos de produtos de origem vegetal, de forma a permitir a utilização racional desses produtos (Queiroz et al., 2009).

O potencial antioxidante de extratos com princípios ativos vegetais ou de compostos puros isolados tem sido frequentemente avaliado existindo, no entanto, poucos estudos sobre as propriedades antioxidantes de formulações finais.

Os géis têm-se tornado cada vez mais populares devido à sua facilidade de aplicação, melhor absorção percutânea (quando comparados com outras preparações semi-sólidas) e resistência ao stresse fisiológico causado pela flexibilidade da pele e movimentos mucociliares, adotando a forma da área aplicada (Haneefa et al., 2010). Os géis podem ser preparados com diversos polímeros nomeadamente, carbopol 940, hidroxietilcelulose e hidroxipropilmetilcelulose. De acordo com testes de estabilidade, tais como stresse térmico, avaliação de pH, viscosidade e armazenamento a diferentes temperaturas, o carbopol 940 parece ser o polímero gelificante mais estável (Queiroz et al., 2009).

#### **1.4. O cancro, uma doença crónica frequentemente relacionada com o stresse oxidativo**

O cancro é uma doença crónica que pode ser caracterizada pelo aparecimento de células que se comportam de forma irregular, perdendo o controlo do seu crescimento e levando a uma proliferação desordenada. As células cancerígenas podem disseminar-se por várias partes do corpo através do sistema sanguíneo e linfático, num processo designado metastização (Almeida et al., 2005).

A profunda ligação do cancro ao stresse oxidativo, em consequência de várias causas, tem originado um debate interessante na comunidade científica, sobretudo no que concerne ao papel dos pró-oxidantes. Enquanto alguns cientistas os apontam como potencialmente cancerígenos, outros discordam e descrevem o seu efeito no sentido de atenuar certos tipos de cancro (Carocho & Ferreira, 2013).

O tratamento mais comum para o cancro é a quimioterapia; os quimioterápicos são classificados de acordo com o seu mecanismo de ação e da fase do ciclo celular em que atuam (Almeida et al., 2005). Todos eles apresentam efeitos secundários significativos e, apesar da sua utilização generalizada, existe um número limitado de medicamentos para o tratamento do cancro (Schmidt & Bastians, 2007) e, nessa perspectiva, o desenvolvimento de novos agentes antitumorais é de extrema importância.

O cancro da mama (abordado neste trabalho através da linha celular humana MCF-7) é o terceiro mais mortal em todo o mundo, sendo o segundo cancro mais comum em mulheres indianas. Todos os anos, mais de 80.000 novos casos de cancro de mama são diagnosticados em Portugal e é uma das principais causas de morte em mulheres. Existe, assim, um grande interesse no desenvolvimento de novos fármacos anticancerígenos ou novas combinações de fármacos e modalidades de tratamento eficazes para pacientes com cancro de mama (Natarajan et al., 2011).

O cancro do pulmão (estudado neste trabalho através da linha celular humana NCI-H460) é um dos mais propícios a metastizações (Chen et al., 2008), sendo também um dos mais frequentes em idosos. A taxa de sobrevivência a longo prazo de doentes com cancro de pulmão tratados com modalidades convencionais, tais como cirurgia, radioterapia e quimioterapia está longe de ser satisfatória (Karthikeyan et al., 2012).

A linha celular tumoral humana HepG2 (utilizada neste trabalho como modelo de carcinoma hepatocelular) é considerada um bom modelo para o estudo *in vitro* do metabolismo xenobiótico e toxicidade para o fígado (Lima et al., 2006).

A linha celular tumoral humana HeLa (usada neste trabalho) foi obtida em 1951 a partir de biópsia de carcinoma cervical. Desde então, as células HeLa têm sido extensivamente replicadas (Amexis et al., 2003). O cancro cervical é a segunda neoplasia mais comum em todo o mundo, depois do cancro de mama nas mulheres; nos países em desenvolvimento é mesmo o mais comum (Guan et al., 2012).

Em suma, o cancro é a maior causa de morte em todo o mundo e, de acordo com as projeções da *World Health Organization* (2010), o número de mortes relacionadas com cancro aumentará para 11 milhões em 2030. Os fitoquímicos podem dar uma preciosa contribuição para a descoberta de moléculas com potencial antitumoral que possam ser usadas no combate a este flagelo mundial.

A grande diversidade estrutural de compostos naturais encontrados nas plantas oferece oportunidades únicas para a descoberta de novos medicamentos. Os compostos fenólicos, principalmente os flavonóides, são um exemplo de compostos bioativos com possíveis efeitos benéficos sobre a saúde humana, incluindo a regulação da proliferação e morte celular associadas ao cancro (López-Lázaro, 2002).

Existem alguns estudos *in vitro* para averiguar a sua ação direta e indireta sobre as células tumorais (Kandaswami et al., 2005), estando referidos vários efeitos anticancerígenos nomeadamente, inibição do crescimento celular (Kandaswami et al., 1991), regulação da atividade de cinases, inibição da indução de apoptose (Lee et al., 2002), supressão da secreção de metaloproteínases matriciais (Kim, 2003) e inibição de comportamento invasivo (Parmar et al., 1994). No entanto, deve ser tido em conta que, *in vivo*, as formas de compostos fenólicos bioativos não são, necessariamente, as formas fitoquímicas naturais, mas sim os seus conjugados e metabolitos (Spencer et al., 2004).

### **1.5. Avaliação de propriedades antioxidantes**

A capacidade antioxidante reflete a ação cumulativa de todos os antioxidantes presentes num extrato ou amostra biológica, proporcionando desta forma uma análise integrada. Esta capacidade pode ser considerada um marcador sensível e confiável para detetar mudanças no stresse oxidativo *in vivo*, ajudando na elucidação de fatores fisiológicos e nutricionais importantes, e ainda, suprimindo informações sobre absorção e biodisponibilidade de compostos antioxidantes (Ghiselli et al., 2000). Contudo, os ensaios realizados *in vitro* são limitados e não existe nenhuma similaridade com sistemas biológicos reais. Os ensaios de capacidade antioxidante *in vitro* são importantes para verificar se há ou não correlação entre antioxidantes fortes e os níveis de stresse oxidativo (Huang et al., 2005).

Torna-se, assim, necessário avaliar as vantagens e desvantagens dos vários métodos em termos de simplicidade de instrumentação, mecanismos, método de quantificação e relevância biológica (Niki, 2010). A melhor solução é, pois, usar vários métodos. Alguns destes procedimentos utilizam antioxidantes sintéticos ou radicais livres, outros são específicos para a peroxidação lipídica e tendem a necessitar de células animais ou células vegetais; alguns têm um objetivo mais amplo, outros exigem manipulação e reagentes mínimos e são rápidos a produzir resultados (Carocho & Ferreira, 2013).

### 1.5.1. Ensaio da capacidade de captação de radicais DPPH

O ensaio de redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) tem sido amplamente utilizado como método químico para investigar o potencial antioxidante de produtos naturais, particularmente em extratos de plantas medicinais (Braca et al., 2001, 2002).

O radical livre DPPH apresenta cor violeta com um máximo de absorvância a 517 nm, que em presença de um antioxidante sofre redução, mudando a sua cor para amarelo e diminuindo a absorvância no comprimento de onda referido (Fig. 4) (Amarowicz et al., 2004; López et al., 2007). Este método de medição da capacidade de doar hidrogénios à amostra é popular devido à sua simplicidade e velocidade de análise (Antolovich et al., 2002).

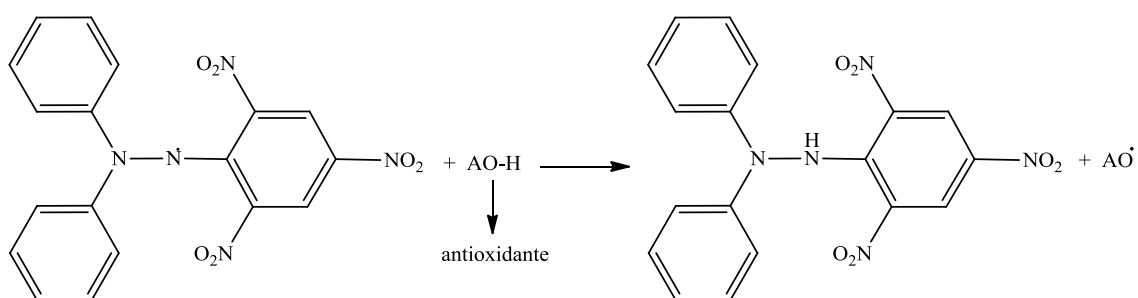


Figura 4. Redução do radical DPPH.

Além do mais, a análise de um grande número de amostras pode ser feita numa microplaca. Porém, apresenta algumas limitações: o DPPH só pode ser dissolvido em meios orgânicos (especialmente em solventes alcoólicos), não em meios aquosos, o que é uma limitação importante ao interpretar o papel dos antioxidantes hidrofílicos. Deve atender-se ao facto deste método ser afetado pela luz, oxigénio e tipo de solvente; acima de um certo teor de água no solvente, há diminuição da capacidade antioxidante (Karadag et al., 2009).

A concentração de antioxidante que causa uma diminuição de 50% da quantidade inicial de DPPH é denominada EC<sub>50</sub>, seguindo-se a mesma designação para os métodos apresentados de seguida.

### 1.5.2. Ensaio do poder redutor

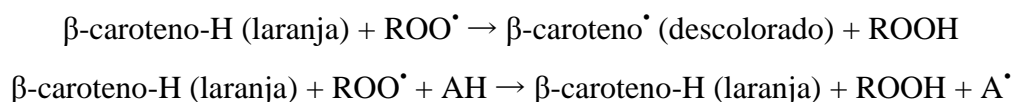
Este ensaio baseia-se na capacidade de redução do Fe(III), que apresenta uma coloração amarela, a Fe(II), que apresenta uma tonalidade entre o verde e o azul; esta reação acontece em meio ácido (Karadag et al., 2009).

Os valores são calculados através da medição do aumento da absorvância a 690nm. Este método foi adaptado, pelo grupo de investigação em que se insere este trabalho, para microplacas de 48 poços, oferecendo uma melhor reprodutibilidade e rendimento. No que diz respeito às suas limitações, qualquer composto (mesmo sem propriedades antioxidantes) com um potencial redox inferior ao do par redox Fe(III)/Fe(II) pode, teoricamente, reduzir o Fe(III) a Fe(II), influenciando e induzindo falsos resultados. Por outro lado, nem todos os antioxidantes reduzem Fe(III). Outro aspeto a ter em consideração é a produção concomitante de Fe(II), que é um conhecido pró-oxidante e pode resultar na formação de radicais adicionais no meio de reação, tal como o radical hidroxilo a partir de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Finalmente, os compostos que absorvem no comprimento de onda da determinação podem interferir, causando sobrestimação do resultado (Magalhães et al., 2008).

### 1.5.3. Ensaio da inibição da descoloração do β-caroteno

O ensaio de inibição da descoloração do β-caroteno é amplamente utilizado para medir a atividade antioxidante dos compostos bioativos, uma vez que o β-caroteno é extremamente suscetível à oxidação do radical linoleato (Bougatef et al., 2008). O β-caroteno sofre descoloração rápida na ausência de um antioxidante. Durante a oxidação, um átomo de hidrogénio é removido do ácido linoleico, dando posteriormente origem ao radical livre pentadienilo que, em seguida, ataca as moléculas altamente insaturadas do β-caroteno num esforço para readquirir o átomo de hidrogénio. Como as moléculas de β-caroteno perdem a sua conjugação, os carotenóides perdem a cor laranja característica, num processo que pode ser monitorizado espectralmente (λ 470nm). A presença de um antioxidante (nomeadamente, fenólico) pode impedir a extensão da destruição do β-caroteno ao neutralizar o radical livre linoleato (ou seja, utilizando o seu potencial redox) e quaisquer outros radicais livres formados no interior do sistema.

Assim, para inibir a descoloração do  $\beta$ -caroteno basta adicionar uma amostra contendo antioxidantes ou extratos vegetais pois estes podem ceder átomos de hidrogénio aos radicais, prevenindo assim a descoloração do  $\beta$ -caroteno (Amarowicz et al., 2004):

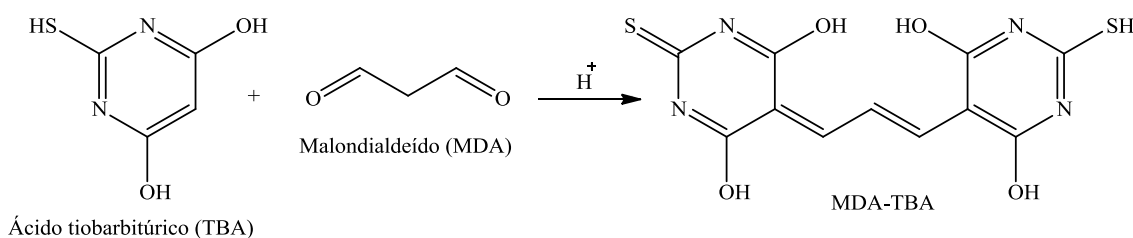


#### 1.5.4. Ensaio das substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Os lípidos livres ou na forma de ésteres de ácidos gordos polinsaturados e colesterol são alvos vulneráveis ao ataque de radicais livres. Muitos estudos têm demonstrado que a peroxidação lipídica induz perturbações e alterações nas membranas biológicas, formando produtos potencialmente tóxicos (Niki, 2010).

A peroxidação lipídica é um processo que envolve radicais livres que atacam sistemas biológicos e pode ser impedida por defesas enzimáticas ou não enzimáticas. Este método baseia-se na medição de malondialdeído (MDA) formado por clivagem de ácidos gordos insaturados após oxidação de um substrato lipídico (Bougatef et al., 2008).

Numa fase inicial, um ião de um metal de transição ou um radical livre oxida o substrato; só então, e após adição de ácido tiobarbitúrico (TBA) se verifica a extensão da oxidação que pode ser medida espectrofotometricamente (Fig.5). Verifica-se, normalmente, uma diminuição da absorvância, uma vez que um antioxidante é adicionado; por esta razão, os resultados são expressos em percentagem de inibição da oxidação (Antolovich et al., 2002).



**Figura 5.** Reação de MDA e TBA na formação de TBARS.

### **1.5.5. Determinação do teor em fenóis: reagente de *Folin-Ciocalteu***

O ensaio de *Folin-Ciocalteu* (FC) é um dos métodos mais antigos de determinação do teor total em fenóis. A técnica deste teste é a mistura de tungstato e molibdato em meio altamente básico (5-10% de solução aquosa de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ). Os fenóis são energeticamente oxidados em meio básico, resultando na formação de radical anião superóxido que, por sua vez, reage com molibdato com formação do óxido de molibdénio,  $\text{MoO}_4^+$ ; este apresenta uma absorvância muito intensa perto dos 750 nm. Os fenóis determinados pelo teste de FC são mais frequentemente expressos em equivalentes de ácido gálico. Porém, o ensaio de FC não é seletivo e apresenta inúmeras interferências (Roginsky & Lissi, 2005). Atualmente, este é um método mais recomendado para avaliar a capacidade antioxidante através do poder redutor dos extratos de amostras vegetais (Prior et al., 2005).

### **1.6. Avaliação do potencial antitumoral e hepatotoxicidade dos extratos**

O teste da sulforrodamina B (SRB) é um método simples, sensível, reprodutível e rápido para avaliação da atividade antiproliferativa (Vichai & Kirtikara, 2006). A SRB é uma aminoxantina de cor rosa brilhante e com dois grupos sulfónicos que são capazes de se ligar às porções terminais dos aminoácidos das proteínas. O teste baseia-se na habilidade da SRB se ligar a componentes proteicos das células fixadas pelo ácido tricloroacético, independentemente da atividade metabólica das células. Estima indiretamente o número de células presentes corando o total de proteína celular (Skehan et al., 1990).

### **1.7. Potencialidades dos fitonutrientes presentes em *Crataegus monogyna***

Durante séculos foram utilizadas plantas para tratar e prevenir uma variedade de doenças humanas, incluindo o cancro. Estudos populacionais mais recentes têm associado o consumo de frutas e vegetais com um risco reduzido para vários tipos de cancro. Esse efeito protetor poderá ser devido aos elevados níveis e variedade de fitonutrientes/fitoquímicos (D'Ambrosio, 2007). Chama-se fitonutrientes a um grupo diverso de produtos químicos que proporcionam às plantas proteção contra diversos predadores e doenças. Embora não sejam uma fonte de energia, minerais ou vitaminas, quando são consumidos de forma moderada pelo Homem podem demonstrar efeitos antioxidantes, antimutagénicos, antiestrogénicos, anticancerígenos e anti-inflamatórios (Jamison & Jennifer, 2003).

As plantas medicinais, também conhecidas como medicamentos fitoterápicos, referem-se a medicamentos obtidos a partir de raízes, caules, folhas, cascas, sementes, frutos e flores, que podem ser usados para promover a saúde geral e tratar doenças. Nos países desenvolvidos, o interesse em fitofármacos aumenta progressivamente e os medicamentos à base de plantas são vistos como medicina de apoio ou uma alternativa à medicina convencional (Abdullah et al., 2012).

Muitas plantas silvestres, apresentam propriedades farmacológicas devido à presença de diferentes classes de produtos naturais ou compostos ativos (Guarrera & Savo, 2013). Pode assegurar-se que as propriedades físicas, químicas, biológicas, farmacológicas e de qualquer tipo, de uma determinada substância determinam as suas aplicações industriais ou medicinais (Feliciano et al., 2008).

No caso específico de *C. monogyna*, como mencionado anteriormente, as flores apresentam na sua maioria tocoferóis, ácido ascórbico e ácidos gordos; os frutos apresentam hidratos de carbono, açúcares, ácidos gordos saturados e polinsaturados. Existem ainda alguns relatos sobre compostos fenólicos presentes em flores e frutos (Barros et al., 2011, 2012; Froehlicher et al., 2009; Liu et al., 2010, 2011).

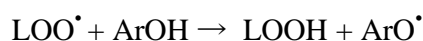
### 1.7.1. Compostos fenólicos

As plantas são excelentes fontes de compostos fenólicos com possíveis aplicações nutricionais e terapêuticas (Shetty, 2004). Os compostos fenólicos são metabolitos secundários amplamente distribuídos em cereais, frutas, plantas herbáceas, legumes e outras plantas comestíveis (Lee et al., 2013). O grupo dos compostos fenólicos inclui os ácidos fenólicos, constituídos pelos ácidos hidroxibenzóicos (por ex. ácido gálico) e ácidos hidroxicinâmicos (por ex. ácido cafeico), estilbenos (por ex. resveratrol), flavonóides (por ex. quercetina, cianidina e catequina) e compostos altamente polimerizados (por ex. lenhinas, melaninas e taninos) (Silva et al., 2007).

Os efeitos positivos dos polifenóis em relação a doenças cardiovasculares estão, provavelmente, relacionados com a sua capacidade para aumentar a atividade antioxidante do plasma sanguíneo e evitar a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e a agregação de plaquetas. Os potenciais efeitos preventivos de cancro podem ser devidos à modulação da atividade de enzimas, diminuindo a carcinogenicidade de xenobióticos e do stress oxidativo induzido. Os polifenóis podem também apresentar propriedades anti-inflamatórias (Barros et al., 2012).

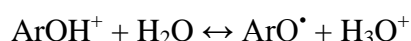
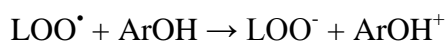
Os compostos fenólicos são antioxidantes com propriedades redox, que lhes permitem atuar como agentes redutores, doadores de hidrogénio e de singletos de oxigénio, tendo ainda propriedades de quelatação de metais (Proestos et al., 2006). Relativamente aos mecanismos, pode ocorrer transferência de:

- (i) átomos de hidrogénio (exemplificada para o processo e peroxidação lipídica):



O radical  $\text{ArO}^{\bullet}$  deve ser estável para reagir lentamente com o substrato LH, mas rapidamente com  $\text{LOO}^{\bullet}$ , interrompendo as reacções em cadeia (Wright et al., 2001).

- (ii) electrão (exemplificada para o processo de peroxidação lipídica):

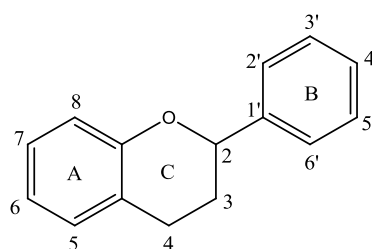


A equação global deste processo é idêntica à do anterior (Wright et al., 2001).

### 1.7.2. Flavonóides

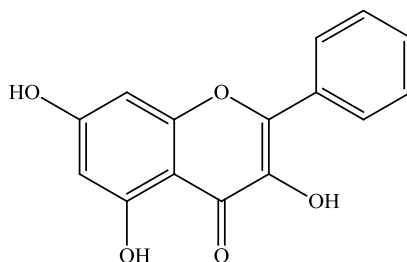
Os flavonóides apresentam uma estrutura  $C_6-C_3-C_6$  comum, que consiste em dois anéis aromáticos (A e B), ligados através de uma cadeia de três carbonos, normalmente organizadas como um heterociclo oxigenado (anel C) (Fraga et al., 2010). São constituídos por um número alargado de famílias de compostos de acordo com o grau de oxidação do heterociclo oxigenado como os flavonóis, flavonas, flavanóis (flava-3-óis), flavanonas, antocianidinas e isoflavonóides (Ratnam et al., 2006; Fraga et al., 2010). As diferenças na estrutura e na substituição vão influenciar a estabilidade do radical fenoxilo e, assim, as propriedades antioxidantes do flavonóide (Wojdyło et al., 2007).

A sua biossíntese deriva de duas vias distintas, a do ácido xiquímico e a do ácido cinâmico. Da via do ácido xiquímico recebe o anel fenilpropano que funciona como iniciador da síntese ao qual se vão ligar três moléculas de ácido acético provenientes da via do acetato, fechando-se num segundo anel que, após várias hidroxilações e reduções, forma um terceiro anel (Fig. 6) (Matkowski, 2008).



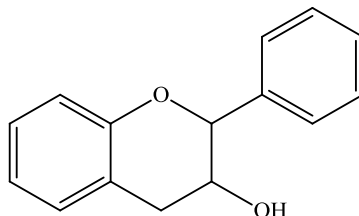
**Figura 6.** Estrutura base dos flavonóides. A- Anel constituído a partir das três moléculas de ácido acético provenientes da via do acetato; B- Anel fenilpropano proveniente da via do ácido xiquímico; C-Anel formado após as hidroxilações e reduções sucessivas.

Os flavonóis são uma das maiores classes de flavonóides e possuem um anel C, com dupla ligação na posição  $C_2-C_3$  (Fig. 7). Estão presentes principalmente na casca dos frutos na forma de monoglicósidos com um resíduo de açúcar ligado ao radical hidroxilo (Herrmann et al., 1976).



**Figura 7.** Estrutura química dos flavonóis.

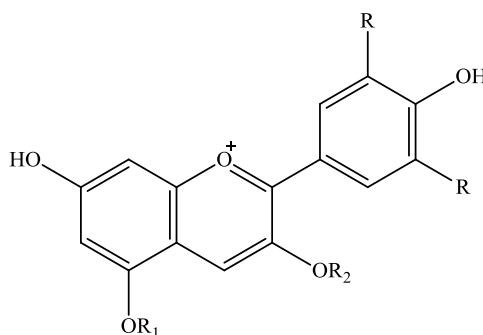
Outro grupo de flavonóides são os flavan-3-óis (flavanóis), existindo na natureza hidroxilados nas posições 5 e 7 do anel A e com estereoquímica variável no carbono 3 do anel C e no grau de hidroxilação do anel B (Fig. 8).



**Figura 8.** Estrutura química geral dos flavan-3-óis.

As estruturas poliméricas de flavan-3-óis (proantocianidinas) podem ser procianidinas derivadas de catequina ou epicatequina (Bate-Smith, 1954).

As antocianinas são pigmentos responsáveis pela coloração vermelha, azul e roxa de uma grande variedade de flores e muitas frutas de cor intensa (Pastrana-Bonilla et al., 2003). A diversidade estrutural das antocianidinas (agliconas de antocianinas) depende do número e posição dos grupos hidroxilo e metoxilo ligados aos anéis aromáticos (A e B). As antocianinas podem diferir na natureza (pentoses, metilpentoses e hexoses), número e posição dos açúcares ligados à molécula e na presença e natureza de ácidos esterificados na molécula de açúcar (Fig. 9). Na maioria dos casos os açúcares ligam-se na posição O-3 podendo também ocorrer ligação em O-5 e O-7 (Goffon & Brun, 1991).



**Figura 9.** Estrutura base de uma antocianina.

## 1.8. Objetivos

Este trabalho teve como objetivos:

- Formular géis hidrossolúveis para aplicação tópica por incorporação de extratos etanólicos e aquosos de diferentes partes (botões florais, flores, frutos imaturos, frutos maduros e frutos em sobre maturação, Fig. 10) de *C. monogyna*, planta utilizada tradicionalmente em aplicações de medicina tradicional.
- Avaliar a sua estabilidade físico-química, facilidade de dispersão e textura não-oleosa.
- Avaliar a atividade antioxidante (efeito captador de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica) das formulações semi-sólidas desenvolvidas para uso tópico, incorporando os extratos de *C. monogyna*.
- Avaliar o potencial antitumoral de extratos fenólicos de quatro partes (botões florais, frutos imaturos, frutos maduros e frutos em sobre maturação, Fig. 10) de *C. monogyna* em linhas celulares tumorais humanas de carcinomas de mama, pulmão, cervical e hepatocelular e, ainda, citotoxicidade em culturas primárias de células de fígado.
- Caracterizar os extratos fenólicos das partes mencionadas anteriormente em compostos fenólicos por HPLC-DAD-ESI/MS. As flores já tinham sido caracterizadas num trabalho anterior da equipa de investigação onde se inseriu este trabalho (Barros et al., 2012).
- Contribuir para a valorização da flora medicinal silvestre e validação das práticas tradicionais.

## **II. Material e métodos**

### **2.1. Padrões e reagentes**

Os padrões utilizados na atividade antioxidante, ácido gálico, catequina, imidazolidinil ureia, trietanolamina, 1,2-propanodiol e ácido poliacrílico (carbopol 940) foram adquiridos à Sigma (St. Louis, MO, EUA), o 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi comprado à Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). Todos os restantes compostos químicos e solventes eram de grau analítico tendo sido comprados a fornecedores especializados. A água foi tratada através de um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, EUA).

Para as análises cromatográficas, o acetonitrilo (grau de pureza HPLC) foi obtido da Merck KgaA (Darmstadt, Alemanha). O ácido fórmico e o ácido trifluoroacético foram adquiridos à Prolabo (VWR International, França). Os padrões de compostos fenólicos foram fornecidos pela Extrasynthese (Genay, França).

Nos ensaios efectuados com culturas celulares, o dimetilsulfóxido (DMSO), de grau analítico, foi comprado à Fisher Scientific (Paris, França).

O soro fetal bovino (FBS), A L-glutamina, a solução salina equilibrada de Hank (HBSS), as soluções de tripsina-ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (100 U/mL) e de penicilina/estreptomicina (100 mg/mL) e os meios Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 e Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) foram fornecidos pela Hyclone (Logan, EUA). Os outros componentes utilizados, ácido acético, elipticina, sulforrodamina B (SRB), azul de tripano, ácido tricloroacético (TCA) e Tris, foram comprados à Sigma Chemical Co. (Saint Louis, EUA).

### **2.2. Amostras**

O material vegetal foi obtido a partir de exemplares arbustivos, durante a primavera, verão e outono de 2009. De acordo com a respetiva fase do ciclo de desenvolvimento da espécie, foram colhidos rebentos, flores e frutos em diferentes estados de maturação, seguindo as práticas de colheita tradicionais, a farmacopeia

popular e os usos medicinais descritos na área de estudo (Bragança, nordeste de Portugal).

Foram consideradas cinco amostras diferentes: botões florais com folhas jovens no topo (corimbos); ramos com folhas e flores em antese (flor totalmente aberta e funcional); frutos imaturos correspondentes à senescência das flores e formados a partir do fruto verde pomáceo; fruto maduro, ou seja, pomos vermelhos no final do Verão, e frutos em estado de maturação avançada (final do outono), ou seja, de cor vermelha-escura, carnudos, doces, de textura viscosa e superfície áspera.

As características morfológicas para reconhecimento e classificação da Flora Ibérica (Castroviejo, 2001) foram utilizadas para a identificação das plantas. Testemunhos do material usado foram depositados no herbário da Escola Superior Agrária de Bragança.

As amostras foram liofilizadas (Ly-8-FM-ULE, Snijders, Holanda) e mantidas a -20 °C para utilização posterior.



**Figura 10.** Diferentes partes de *Crataegus monogyna* (Barros et al, 2011) usadas neste trabalho

### 2.3. Preparação das amostras: extratos e géis hidrossolúveis

Cada amostra ( $\approx 1$ g) foi extraída por agitação magnética com 50 mL de etanol (extratos etanólicos), água desionizada (extrato aquoso) ou 30 mL de metanol:água 80:20 (v/v) (extratos fenólicos), à temperatura ambiente, 150 rpm durante 1 h. Os extratos foram filtrados através de filtros de papel Whatman nº 4. Os resíduos obtidos foram re-extraídos sob as mesmas condições. Os extratos combinados foram evaporados a 35 °C (evaporador rotativo Buchi R-210) sob pressão reduzida, para remover o metanol e o etanol; as fases aquosas foram liofilizadas. Os extratos etanólicos e aquosos foram redissolvidos no respectivo solvente de extração e armazenados a 4 °C para avaliação da atividade antioxidante. Os extratos fenólicos foram dissolvidos em DMSO (8 mg/mL) para avaliação da atividade antiproliferativa em linhas celulares tumorais e não-tumorais, ou em metanol:água 20:80 (v/v) para a sua caracterização cromatográfica em compostos fenólicos.

Para os géis, foi preparada uma base semi-sólida por adição de 0,5 g de Carbopol 940 a 20 mL de água desionizada. A mistura foi deixada em repouso durante 1 h, após a qual se adicionou 1 mL de trietanolamina e 5 mL de extrato (aquoso ou etanólico) a 1 mg/mL (correspondente a uma concentração final de 100  $\mu$ g/mL). De seguida, adicionou-se ácido cítrico (0,45 g), EDTA dissódico (0,005 g), imidazolidinil-ureia (0,1 g) e propileno glicol (7,5 g). O produto final foi ajustado a 50 g, por adição de água desionizada, e submetido a ensaios de avaliação da atividade antioxidante.

Uma formulação base (controlo negativo) foi também preparada nas mesmas condições, mas sem incorporar extrato. Três géis comerciais de diferentes marcas foram utilizados como padrões.



**Figura 11.** Extratos isolados e respetivos géis.

## **2.4. Avaliação da atividade antioxidante**

### **2.4.1. Atividade captadora de radicais DPPH**

Esta metodologia foi executada num Leitor de Microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Inc.). Amostras (30  $\mu$ L) de cada uma das diferentes concentrações de extrato foram colocadas em triplicado nos poços juntamente com a solução de DPPH (2700  $\mu$ L,  $6 \times 10^{-5}$  mol/L). A mistura foi deixada ao abrigo da luz durante 30 min. A redução do radical DPPH foi avaliada através da absorvância a 515 nm. A atividade captadora de radicais livres (RSA) foi calculada em função da percentagem de descoloração do DPPH usando a equação:  $\% \text{ RSA} = [(A_{\text{DPPH}} - A_{\text{S}})/A_{\text{DPPH}}] \times 100$ , onde  $A_{\text{S}}$  é a absorvância da solução na presença de extrato numa determinada concentração e  $A_{\text{DPPH}}$  é a absorvância da solução de DPPH. A concentração de extrato correspondente a 50% da actividade captadora de radicais ( $\text{EC}_{50}$ ) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem de RSA em função da concentração da amostra.

### 2.4.2. Poder redutor

Para este método foi utilizado o leitor de microplacas indicado em 2.4.1. Às diferentes concentrações de extrato (0,5 mL) foi adicionado tampão fosfato de sódio (200 mmol.L<sup>-1</sup>, pH 6,6, 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1%, w/v, 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min. Adicionou-se posteriormente ácido tricloroacético (10%, w/v, 0,5 mL). Parte (0,8 mL) do volume da anterior mistura reacional foi colocada na placa adicionando-se de seguida água desionizada (0,8 mL) e cloreto de ferro (III) (0,1%, w/v 0,16 mL). Mediu-se a absorvância a 690 nm sendo a concentração de extrato com 0,5 de absorvância (EC<sub>50</sub>) calculada por interpolação a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração da amostra.

### 2.4.3. Inibição da descoloração do $\beta$ -caroteno

Preparou-se, por dissolução, uma solução de  $\beta$ -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 mL). Pipetou-se 2 mL desta solução para um balão de fundo redondo e evaporou-se o clorofórmio a 40 °C sob vácuo. Aos 0,2 mg de  $\beta$ -caroteno resultantes, adicionou-se ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL), agitando vigorosamente até emulsionar. Transferiram-se 4,8 mL desta emulsão para tubos de ensaio contendo 0,2 mL de cada uma das diferentes concentrações dos extratos. Os tubos foram agitados (vortex) e incubados a 50 °C em banho-maria. Logo que a emulsão foi adicionada a cada tubo, a absorvância foi medida (tempo zero) a 470 nm (espectrofotómetro AnalytikJena 200-2004), tendo sido novamente medida no final da incubação. A inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação: (conteúdo do  $\beta$ -caroteno após 2h de ensaio/conteúdo  $\beta$ -caroteno inicial)  $\times$  100. A concentração de extrato que origina 50% de actividade antioxidante (EC<sub>50</sub>) foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno em função da concentração da amostra.

#### 2.4.4. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Neste método de determinação da inibição da peroxidação lipídica foi utilizado tecido cerebral de porco (*Sus scrofa*). O tecido foi dissecado e homogeneizado com tampão tris-HCl (20 mM, pH 7,4) numa proporção 1:2 (w/v), em banho de gelo. A mistura foi agitada e centrifugada a 3000g durante 10 min. Ao sobrenadante (0,1 mL) deste homogeneizado cerebral, adicionou-se cada uma das diferentes soluções de extrato (0,2 mL), ácido ascórbico (0,1 mL) e sulfato de ferro (0,1 mL). A mistura reaccional foi incubada durante 1 hora a 37 °C. A reacção foi parada pela adição de ácido tricloroacético (28%, w/v, 0,5 mL), seguido de ácido tiobarbitúrico (TBA, 2%, w/v, 0,38 mL); esta mistura foi depois aquecida a 80 °C durante 20 min. Decorrido este período, centrifugou-se a 3000 rpm durante 10 min para remover a proteína precipitada. A intensidade da cor do complexo malondialdeído-ácido tiobarbitúrico (MDA-TBA) no 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 a absorvância do controlo e da solução com o extrato, respetivamente. A concentração de extrato correspondente a 50% de inibição da peroxidação lipídica ( $EC_{50}$ ) foi calculada por interpolação a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração da amostra.

#### 2.5. Determinação do teor em fenóis e flavonóides totais

Para quantificação dos fenóis totais, uma alíquota (1 mL) do extrato com concentração mais próxima da  $EC_{50}$  foi misturada com reagente *Folin-Ciocalteu* (5 mL, previamente diluída com água a 1:10, v/v) e carbonato de sódio (75 g/L, 4 mL). Os tubos foram agitados durante 15 s e deixados em repouso durante 30 min a 40 °C para o desenvolvimento de cor. Após o final da reacção, mediu-se a absorvância a 765 nm. O ácido gálico foi usado para calcular a curva padrão ( $9,4 \times 10^{-3}$  -  $1,5 \times 10^{-1}$  mg/mL), sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por grama de amostra.

Para os flavonóides, uma alíquota (0,5 ml) da solução do extrato com concentração mais próxima da  $EC_{50}$  foi misturada com água destilada (2 mL) e com  $NaNO_2$  (0,15 mL, 5% m/v). Após 6 min, adicionou-se  $AlCl_3$  (0,15 mL, 10% m/v), deixando repousar a mistura por mais 6 min. De seguida, adicionou-se  $NaOH$  (2 mL, 4% m/v) e água desionizada para perfazer um volume final de 5 mL, deixando-se repousar durante 15 min. A intensidade da coloração foi medida a 510 nm. A curva padrão foi obtida com catequina ( $4,5 \times 10^{-3}$  -  $2,9 \times 10^{-1}$  mg/mL), sendo os resultados expressos em mg de equivalentes de catequina (CE) por grama de amostra.

Nota: Os métodos de atividade antioxidante e determinação do teor em fenóis totais foram aplicados aos extratos etanólicos e aquosos e aos géis preparados de acordo com o descrito na secção 2.3. A atividade antioxidante dos extratos fenólicos não foi avaliada neste trabalho por já ter sido estudada por outros elementos do grupo de investigação em que se inseriu este trabalho (Barros et al., 2011).

## **2.6. Avaliação da atividade inibitória do crescimento de linhas celulares tumorais humanas**

O efeito dos extratos fenólicos (preparados de acordo com o descrito na secção 2.3.) sobre o crescimento de linhas celulares tumorais humanas foi avaliado de acordo com o processo adoptado do *National Cancer Institute* (NCI) para o rastreio *in vitro* de drogas anti-cancerígenas, que utiliza o ensaio da sulforrodamina B (SRB) para avaliar a inibição do crescimento celular (Skehan et al., 1990; Vichai & Kirtikara, 2006). Foram utilizadas quatro linhas celulares tumorais humanas: MCF-7 (adenocarcinoma da mama), NCI-H460 (cancro do pulmão de células não-pequenas), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular). As células foram mantidas em culturas aderentes em meio RPMI-1640 contendo 10% de FBS inativado pelo calor (MCF-7 e NCI-H460), ou em meio DMEM suplementado com 10% de FBS, glutamina (2 mM), penicilina (100 U/mL) e de estreptomicina (100 mg/ml) (HeLa e HepG2), a 37 °C, numa incubadora de ar humidificado contendo 5% de  $CO_2$ . Cada linha celular foi plaqueada com uma densidade adequada ( $7,5 \times 10^3$  células/poço para as MCF-7 e NCI-H460;

$1,0 \times 10^4$  células/poço para as células HeLa e HepG2) em placas de 96 poços, deixando aderir durante 24 h. As células foram então tratadas durante 48 horas com várias concentrações dos extratos. As concentrações de DMSO utilizadas não tiveram qualquer efeito inibidor no crescimento destas linhas celulares.

Após este período de incubação, as células aderentes foram fixadas por adição de ácido tricloroacético frio a 10% (TCA, 100  $\mu$ l) e incubadas durante 60 min a 4 °C. As placas foram então lavadas com água desionizada e secas; adicionou-se SRB (0,1% em 1% de ácido acético, 100  $\mu$ L) a cada poço da placa, incubando-se de seguida durante 30 min à temperatura ambiente. A SRB não ligada foi removida por lavagem com 1% de ácido acético. As placas foram secas ao ar, e a SRB ligada foi solubilizada com Tris (10 mM; 200  $\mu$ L). A absorvância foi depois medida a 540 nm no leitor de microplacas já indicado. Foram obtidas curvas de dose-resposta para cada extrato testado e cada linha celular, calculando-se o valor de GI<sub>50</sub>, que corresponde à concentração do extrato que inibiu 50% do crescimento celular. A elipticina foi utilizada como controlo positivo.

## **2.7. Avaliação da atividade inibitória do crescimento de células não tumorais**

Preparou-se uma cultura celular (designada como PLP2) a partir de fígado de porco recém-obtido num matadouro local. Resumidamente, o tecido hepático foi lavado com solução salina equilibrada de Hank contendo penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100  $\mu$ g/mL) e depois dividido em explantes com 1 mm<sup>3</sup>. Alguns destes explantes foram colocados em frascos de cultura de tecidos de 25 cm<sup>2</sup> com meio DMEM suplementado com 10% de FBS, aminoácidos não essenciais (2 mM), penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 mg/mL) e incubados a 37 °C com ar humidificado contendo 5% de CO<sub>2</sub>. O meio foi substituído a cada dois dias. A cultura das células foi acompanhada com monitorização direta a cada dois ou três dias, utilizando um microscópio de contraste de fase. Antes da confluência ser alcançada, as células foram subcultivadas e plaqueadas em placas de 96 poços com uma densidade de  $1,0 \times 10^4$  células/poço, e cultivadas em meio DMEM com FBS (10%) penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100  $\mu$ g/mL) (Abreu et al., 2011). O efeito dos extratos fenólicos (preparados de acordo com o descrito na secção 2.3.) sobre o crescimento da cultura celular PLP2 foi avaliado de acordo com o descrito na secção anterior.

## 2.8. Caracterização química dos extratos fenólicos

### 2.8.1. Análise de compostos fenólicos não-antociânicos

Os extratos fenólicos (cuja preparação foi descrita na secção 2.3.) foram filtrados através de um disco LC descartável de 0,22µm e analisados usando um cromatógrafo Hewlett-Packard 1100 (Agilent Technologies) com uma bomba quaternária e um detector de díodos (DAD), acoplado a um programa de processamento de dados HP Chem Station (rev. A.05.04). Foi utilizada uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C<sub>18</sub>, 3 µm (4,6 mm×150 mm) termostaticada a 35 °C. Os solventes utilizados foram: (A) 0,1% de ácido fórmico em água, (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição estabelecido foi: 15% de B (isocrático) durante 5 minutos; 15% a 20% de B ao longo de 5 min; 20% a 25% B em 10 min; 25-35% de B ao longo de 10 min; 35-50% durante 10 min; reequilíbrio da coluna usando um fluxo de 0,5 mL/min. Foi feita uma deteção dupla *online* no DAD, utilizando como comprimentos de onda preferenciais 280 nm e 370 nm, e no espectrómetro de massa (MS) ligado ao sistema de HPLC por meio da saída da célula de DAD.

A deteção MS foi realizada num sistema API 3200 QTRAP (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização de nebulização electrónica (ESI) e um analisador de massa de triplo quadrupolo-captador de iões controlado pelo software Analyst 5.1. O gás de nebulização (30 psi) utilizado foi ar de grau zero, ou seja isento de hidrocarbonetos, sendo utilizado gás turbo para a secagem de solventes (400 °C, 40 psi).

O azoto serviu como “cortina” (20 psi) e gás de colisão (médio). Os quadrupolos foram fixados em unidades de resolução. A tensão de nebulização dos iões foi estabelecida a -4500 V em modo negativo. O detetor de MS foi programado para executar dois modos consecutivos: MS aperfeiçoada (EMS) e análise melhorada dos iões produzidos (EPI). O sistema EMS foi utilizado para gravar os espetros de varrimento completo para obter uma perspetiva geral de todos os iões na amostra. As configurações utilizadas foram: potencial de desagregação (DP) -450 V, potencial de entrada (PE) -6 V, energia de colisão (CE) -10 V. Os espetros foram registados no modo de iões negativos entre  $m/z$  100 e 1000. As análises no modo EPI foram posteriormente aplicadas para se obter o padrão de fragmentação do(s) ião(ões) precursor(es) detetados no passo anterior, utilizando os seguintes parâmetros: DP -50 V, EP -6 V, CE -25 V, e difusão da energia de colisão (CES) 0 V.

Os compostos fenólicos presentes nas amostras foram caracterizados de acordo com os seus espectros de UV e de massa e com os tempos de retenção por comparação com padrões comerciais, quando disponíveis. Para a análise quantitativa de compostos fenólicos, foi obtida uma curva de calibração por injeção de concentrações conhecidas (1-100 µg/mL) de diferentes padrões: (+)-catequina ( $y = 158,42x - 11,38$ ;  $R^2 = 0,999$ ); (-)-epicatequina ( $y = 160,86x - 6,3472$ ;  $R^2 = 0,999$ ); ácido caféico ( $y = 611,9x - 4,5733$ ;  $R^2 = 0,999$ ); ácido clorogénico ( $y = 313,03x - 58,2$ ;  $R^2 = 0,999$ ); ácido *p*-cumárico ( $y = 884,6x - 184,49$ ;  $R^2 = 0,999$ ), ácido ferúlico ( $y = 505,97x - 64,578$ ;  $R^2 = 0,999$ ); apigenina-7-*O*-glucósido ( $y = 159,62x + 7,5025$ ;  $R^2 = 0,999$ ); quercetina-3-*O*-glucósido ( $y = 253,52x - 11,615$ ;  $R^2 = 0,999$ ); canferol-3-*O*-glucósido ( $y = 288,55x - 4,0503$ ;  $R^2 = 1,000$ ); ácido *p*-hidroxibenzóico ( $y = 265,74x - 87,777$ ;  $R^2 = 0,999$ ); ácido protocatéquico ( $y = 291,1x - 6,4558$ ;  $R^2 = 0,999$ ).

### 2.8.2. Análise de antocianinas

Cada amostra (1 g) foi extraída com 30 mL de metanol contendo 0,5% de TFA e filtrada através de um filtro de papel Whatman n. 4. O resíduo foi em seguida re-extraído duas vezes nas mesmas condições. Os extratos combinados foram evaporados a 35 °C para remover o metanol e redissolvidos em água. Na etapa de purificação, os extratos foram tratados num cartucho C<sub>18</sub> SepPak®Vac (3 cm<sup>3</sup>) (Phenomenex), previamente ativado com metanol e depois com água.

Os açúcares e as substâncias mais polares foram removidos passando 15 ml de água e os pigmentos antociânicos foram eluídos com 5 ml de metanol/água (80:20, v/v) contendo 0,1% de TFA. O extrato metanólico foi concentrado sob vácuo, liofilizado, redissolvido em 1 mL de solução aquosa de metanol (20%) e filtrado através de um disco LC descartável de 0,22 µm para análise por HPLC. Os extratos foram analisados no sistema de HPLC acima referido, utilizando as condições descritas por García-Marino et al. (2010). A separação foi conseguida numa coluna C<sub>18</sub> AQUA® (Phenomenex) de fase reversa (5 µm, 150 mm×4,6 mm ID), termostaticada a 35 °C. Os solventes utilizados foram: (A) TFA a 0,1% em água e (B) 100% de acetonitrilo. O gradiente utilizado foi: 10% B durante 3 minutos de modo isocrático; 10 a 15% de B em 12 min; 15% B durante 5 minutos em modo isocrático; 15 a 18% de B durante 5 minutos; 18 a 30% de B durante 20 min; 30 a 35% durante 5 min, com um fluxo de 0,5 mL/min.

A deteção em duplicado foi realizada por DAD, utilizando 520 nm como o comprimento de onda preferido, e por MS, no mesmo equipamento antes descrito. O gás de nebulização (40 psi) utilizado foi ar de grau zero, sendo utilizado gás turbo para a secagem de solventes (600 °C, 50 psi). O azoto serviu como “cortina” (100 psi) e gás de colisão (alto). Os quadrupolos foram fixados em unidades de resolução. A tensão de nebulização dos iões foi estabelecida a 5000 V em modo positivo. Os métodos SEM e EPI foram utilizados para a aquisição de espectros de varrimento total e padrões de fragmentação dos iões precursores, respetivamente. Os parâmetros definidos para o modo EMS foram DP 41 V, PE 7,5 V, CE 10 V; para o modo EPI foram DP 41 V, EP 7,5 V, CE 10 V, CES 0 V.

As antocianinas presentes nas amostras foram caracterizadas de acordo com os espectros de UV e de massa, com os tempos de retenção e por comparação com padrões, quando disponíveis. Para a análise quantitativa de antocianinas, foi obtida uma curva de calibração por injeção de concentrações conhecidas (0,25-50 µg/mL) de diferentes padrões: cianidina-3-*O*-glucósido ( $y = 63027x - 153,83$ ;  $R^2 = 0,9995$ ), pelargonidina-3-*O*-glucósido ( $y = 268748x - 71,423$ ;  $R^2 = 1,0000$ ) e peonidina-3-*O*-glucósido ( $y = 537017x - 71,469$ ;  $R^2 = 0,9997$ ).

## 2.9. Análise estatística

Para cada extrato foram consideradas três amostras, sendo cada amostra analisada em duplicado (análises cromatográficas) ou triplicado (ensaios de bioatividade). Os resultados são expressos como média±desvio-padrão. As diferenças estatísticas representadas com letras foram verificadas através de análise de variância (ANOVA) a um fator, seguida do teste de Tukey (para distribuições homoscedásticas) ou de Tamhane's T2 (distribuições heteroscedásticas) acoplados ao método de Welch. A normalidade entre grupos de amostras e a homogeneidade das variâncias e das matrizes de variância-covariância foram verificadas pelo teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors, o teste de Levene e o teste M-Box, respetivamente. Todos os testes estatísticos com  $\alpha=0,05$  utilizando o programa *Statistical Package for Social Sciences* (SPSS), v. 18.0.

### III. Resultados e discussão

#### 3.1. Atividade antioxidante dos extratos etanólicos e aquosos e dos géis preparados com esses extratos

Tal como já mencionado, a espécie *C. monogyna*, tem vindo a ser usada como planta medicinal na Península Ibérica desde há muito tempo. Ainda hoje é reconhecida por ter vários benefícios para a saúde, como são os casos já indicados de prevenção e controlo de doenças relacionadas com o envelhecimento, distúrbios do sistema nervoso ou tratamento de infeções respiratórias superiores, celulite, obesidade e distúrbios da menopausa (Camejo-Rodrigues et al., 2003; Novais et al., 2004; Neves et al., 2009; Carvalho, 2010; Barros et al., 2012). Assim sendo, os extratos de *C. monogyna* podem ter potencial para serem incluídos em formulações tópicas para fins dermocosméticos.

Para comparar o potencial antioxidante das diferentes partes de *C. monogyna* extraídas com solventes de baixa toxicidade, realizaram-se quatro ensaios *in vitro*, nomeadamente atividade captadora de radicais DPPH, poder redutor, inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno e inibição da formação de TBARS. Os resultados obtidos para estes ensaios, bem como os correspondentes ao conteúdo de fenóis totais, são apresentados na Tabela 1. A bioatividade observada para cada parte botânica parece estar relacionada com o solvente utilizado e com o ensaio (com exceção do ensaio de inibição de formação de TBARS). Apesar de alguns efeitos estarem relacionados com a composição e a atividade, as diferenças encontradas podem estar relacionadas com diferentes rendimentos: as partes mais bioativas foram as que apresentaram rendimentos menores, indicando que os seus extratos podem conter menos interferentes.

Os extratos etanólicos de botões florais e frutos imaturos apresentaram maior atividade no ensaio do DPPH; o extrato etanólico de botões florais apresentou um poder redutor máximo; por sua vez, os extratos aquosos de frutos imaturos e de flores apresentaram o maior efeito de inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno; o extrato etanólico de frutos imaturos apresentou uma maior atividade no ensaio de inibição da formação de TBARS. Apesar destes bons indicadores de bioatividade, os valores obtidos mostraram atividade antioxidante menor do que aqueles obtidos com extratos metanólicos (Barros et al., 2011), mas os solventes testados neste trabalho são mais adequados para serem incorporados em produtos de dermocosmética. As diferenças observadas na atividade antioxidante foram refletidas no conteúdo em fenóis e

flavonóides totais, mas só foi encontrada uma forte correlação linear entre a atividade de captação de radicais DPPH e o teor de fenóis totais (Fig.12).

**Tabela 1.** Atividade antioxidante (EC<sub>50</sub> em µg/mL), teor em fenóis (mg GAE/g) e flavonóides (mg CE/g) totais dos extratos preparados a partir de diferentes partes de *C. monogyna*.

		Rendimento (%)	Efeito captador de DPPH <sup>1</sup>	Poder redutor <sup>1</sup>	Inibição da descoloração do β-caroteno <sup>1</sup>	Inibição de TBARS <sup>1</sup>	Fenóis totais <sup>1</sup>	Flavonóides totais <sup>1</sup>
FIB	Etanólico	13±1 d	115±9 i	72±2 g	125±4 b	9.9±0.2 d	153±7 b	45±1 b
	Aquoso	32±2 b	415±4 f	453±21 c	74±1 c	61±1 c	98±1 d	23±1 cd
FI	Etanólico	13±1 d	167±6 h	110±4 f	153±7 c	9.0±0.3 d	170±3 a	31±2 c
	Aquoso	32±2 b	811±14 c	959±5 a	59±6 e	79±2 b	56±1 f	17±2 de
UF	Etanólico	4.3±0.2 e	114±6 i	232±4 e	68±8 de	8±1 d	166±19 a	108±8 a
	Aquoso	12±1 d	323±13 g	466±16 c	57±11 e	72±6 b	118±1 c	54±3 b
RF	Etanólico	25±2 c	629±28 d	276±5 d	74±21 d	9,1±0,3 d	83±2 e	51±14 b
	Aquoso	32±2 b	922±35 b	931±23 b	185±8 a	81±6 b	48±1 f	9±1 ef
ORF	Etanólico	35±3 b	445±19 e	259±1 d	79±8 c	8,9±0,2 d	81±7 e	12±2 ef
	Aquoso	64±4 a	970±20 a	934±23 b	70±2 de	137±18 a	21±1 g	6±1 f
Homocedasticidade <sup>2</sup>	Valor de <i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
Distribution normal <sup>3</sup>	Valor de <i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
ANOVA a 1 fator <sup>4</sup>	Valor de <i>p</i>	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001

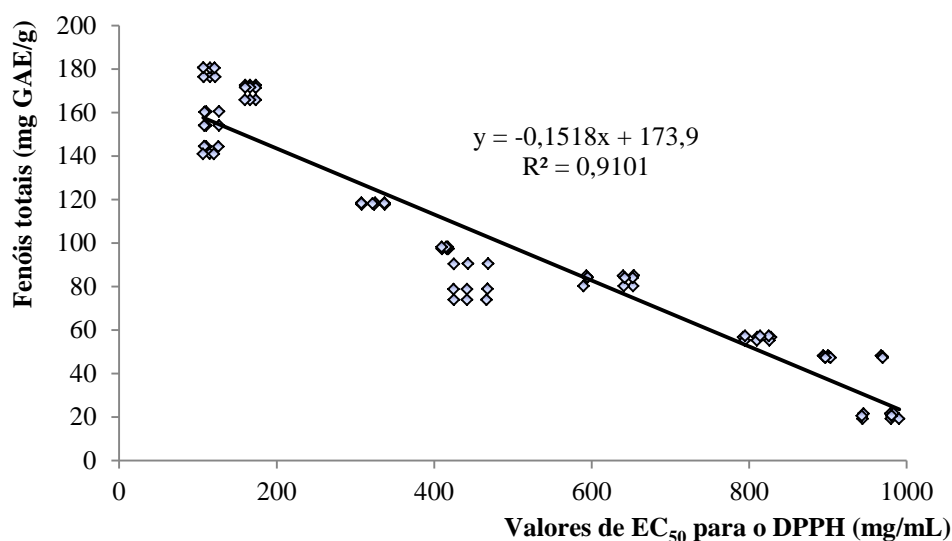
FIB- botões florais ; FI- flores; UF- frutos imaturos; RF- frutos maduros; ORF- frutos em sobre maturação.

<sup>1</sup>Letras diferentes em cada coluna indicam valores médios que diferem significativamente ( $p < 0,001$ ). Essas diferenças foram classificadas pelo teste de Tamhane T2, já não se verificou homocedasticidade.

<sup>2</sup>A homocedasticidade entre as cultivares calculada através do teste de Levene.

<sup>3</sup>O tipo de distribuição dos resíduos foi avaliado através do teste de Kolmogorov-Smirnov com correção de Lilliefors ( $n > 20$ ).

<sup>4</sup>Como  $p < 0,05$ , o valor médio do parâmetro avaliado difere dos outros em pelo menos um extrato, logo a comparação múltipla pode ser realizada.



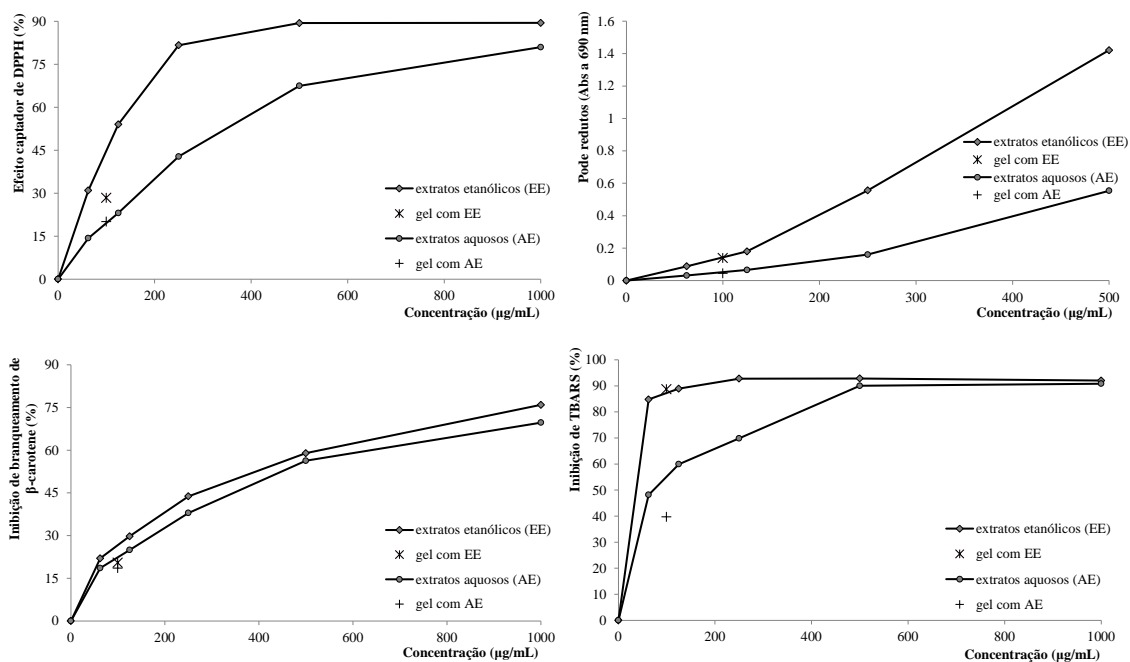
**Figura 12.** Correlação entre a atividade captadora de radicais livres (DPPH) e o conteúdo em fenóis totais (todos os resultados foram utilizados).

Em geral, os extratos etanólicos provaram possuir maior poder antioxidante do que os extratos aquosos (Tabela 1). Comparando as partes de *C. monogyna*, as flores (para extratos alcoólicos) e os frutos imaturos (para extratos aquosos) apresentaram a maior quantidade de fenóis totais e flavonóides. No entanto, os valores foram inferiores aos obtidos com extratos metanólicos (Barros et al., 2011).

De seguida verificou-se se a atividade antioxidante de cada extrato se mantinha depois de incorporado no gel hidrossolúvel correspondente. Para se conseguir a consistência do gel pretendida, várias percentagens de Carbopol 940 foram testadas, tendo sido concluído que a concentração de 1% permitiu obter os melhores resultados. A cor dos géis preparados variou do verde pálido (mais evidente nos preparados com extratos etanólicos) à cor levemente acastanhada. As formulações preparadas apresentaram uma textura não gordurosa adequada e foram imediatamente absorvidos pela pele. Para fins de comparação, os géis hidrossolúveis foram todos preparados com 100 µg de extrato/mL de gel. Uma vez que a inclusão de parabens é atualmente mal aceite pelos consumidores, foi incluída imidazolidinilureia como componente antimicrobiano. Em relação à avaliação do pH (verificado em temperatura ambiente, logo após a preparação empregando um medidor de pH digital de Hanna Instruments), não se verificaram alterações significativas durante os 90 dias de observação em todos os géis analisados, com valores de pH variando entre 5,5 e 6,5.

A determinação do pH tem relevância para avaliar a estabilidade de formulações farmacêuticas, uma vez que podem ocorrer alterações nos valores de pH devido às impurezas, a decomposição por hidrólise, ou erros de procedimento. Nesta fase, não seria aconselhável a inclusão de diferentes espécies de plantas ou mesmo de diferentes partes da mesma planta na mesma formulação de um gel hidrossolúvel, dado que a segurança e a eficácia de um fármaco fitoterápico devem ser definidos para cada produto. Estes recursos dependem de vários fatores, tais como a metodologia de obtenção dos extratos ou a formulação e a forma farmacêutica do produto final (Queiroz et al., 2009).

Depois de preparados, os géis hidrossolúveis passaram pelos mesmos ensaios antioxidantes aplicados aos extratos, utilizando também um controlo de referência, com todos os componentes utilizados na formulação do gel hidrossolúvel, exceto o extrato. O valor de atividade antioxidante correspondente à mesma concentração (100 µg de extrato/mL) também foi calculado para cada extrato isolado (Tabela 2). Como pode ser visto na Fig. 13, a atividade antioxidante medida em cada gel hidrossolúvel é muito próxima do valor obtido para o extrato isolado. Em alguns casos (por exemplo, o gel com extrato aquoso no ensaio DPPH), os valores são sobrepostos, ou ainda mais elevados (gel com o extrato etanólico no ensaio de inibição de TBARS).



**Figura 13.** Atividade antioxidante de frutos imaturos de *C. monogyna* em extratos etanólicos e aquosos. Comparação com o valor obtido para cada gel hidrossolúvel (incorporado com 100 µg/mL de extrato).

Uma vez que seria impraticável apresentar gráficos para todos os ensaios, os dados completos sobre a comparação anterior podem ser analisados na Tabela 2. Tornou-se evidente que a inclusão de extratos nos géis hidrossolúveis causou perdas muito limitadas na sua bioatividade. Desse modo, a formulação preparada pareceu ser adequada para o objetivo pretendido.

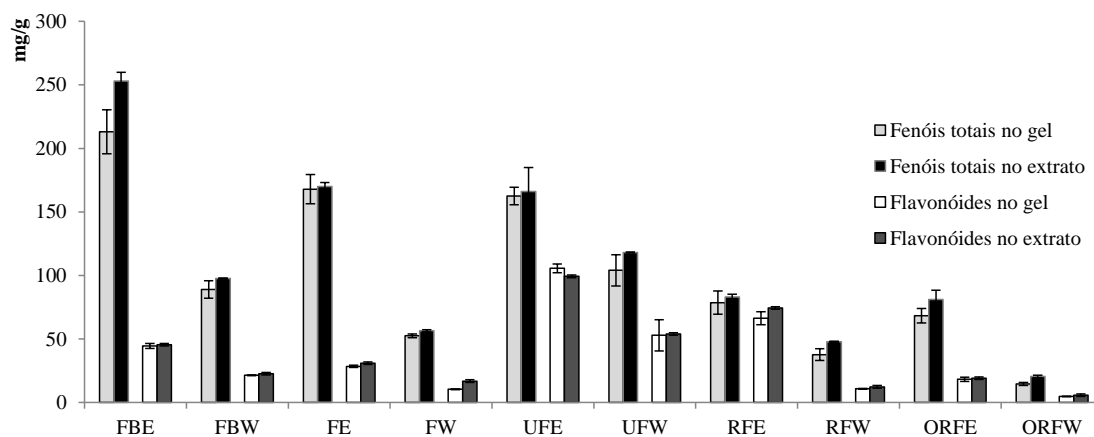
**Tabela 2.** Atividade antioxidante dos géis hidrossolúveis (com incorporação de extrato a 100 µg/mL) e dos extratos (100 µg/mL) de diferentes partes de *C. monogyna*.

			Captação de DPPH (%)	Poder redutor (Abs <sub>690 nm</sub> )	Inibição da descoloração de β- caroteno (%)	Inibição TBARS (%)
FIB	Etanólico	Gel hidrossolúvel	33±4	0,7±0,2	24±3	87±3
		Extrato	43±3	0,66±0,01	27±1	90±1
	Aquoso	Gel hidrossolúvel	11±1	0,051±0,0001	39±1	62±1
		Extrato	14±1	0,056±0,005	46±2	69±1
FI	Etanólico	Gel hidrossolúvel	28±3	0,50±0,01	30±1	81±2
		Extrato	31±1	0,50±0,03	35±1	90±1
	Aquoso	Gel hidrossolúvel	6±1	0,13±0,01	39±1	47±4
		Extrato	14±1	0,146±0,004	46±1	57±2
UF	Etanólico	Gel hidrossolúvel	28±4	0,14±0,04	60±1	69±1
		Extrato	45±2	0,15±0,01	87±1	77±3
	Aquoso	Gel hidrossolúvel	20±3	0,04±0,01	48±2	26±1
		Extrato	20±1	0,051±0,002	65±6	39±2
RF	Etanólico	Gel hidrossolúvel	15±1	0,33±0,01	37±4	74±1
		Extrato	14±1	0,22±0,03	45±1	84±2
	Aquoso	Gel hidrossolúvel	9±1	0,45±0,04	40±1	50±2
		Extrato	10±1	0,07±0,01	40±1	56±2
ORF	Etanólico	Gel hidrossolúvel	15±1	0,44±0,04	35±1	67±1
		Extrato	15±2	0,23±0,01	41±1	86±4
	Aquoso	Gel hidrossolúvel	5±1	0,37±0,04	38±2	24±2
		Extrato	16±3	0,064±0,004	41±1	28±1

A atividade antioxidante dos extratos isolados foi obtida pela interpolação nos gráficos de atividade antioxidante *versus* concentração de extrato. FLB- botões florais; FI- flores; UF- frutos imaturos; RF- frutos maduros; ORF- frutos em sobre maturação.

Para além dos ensaios de atividade antioxidante, os conteúdos em fenóis e flavonóides totais também foram comparados (Fig.14). Os géis preparados mantiveram uma elevada percentagem dos fenóis e flavonóides dos extratos correspondentes incluídos nas suas formulações. Quando comparados com produtos semelhantes altamente valorizados no mercado (amostras comerciais denominadas por A, B e C), os géis hidrossolúveis obtidos com diferentes partes de *C. monogyna* apresentaram valores inferiores de fenóis totais (A:  $103 \pm 19$ , B:  $53 \pm 2$ ; C:  $26 \pm 2$  mg GAE/g) e flavonóides (A:  $29 \pm 2$ ; B:  $29 \pm 3$ ; C:  $23 \pm 2$  mg de CE/g). No entanto, deve ser lembrado que os resultados obtidos para os géis preparados neste estudo, foram calculados subtraindo os resultados da formulação de base (controlo negativo), que incluía todos os ingredientes à exceção do extrato, enquanto os géis comerciais foram analisados sem qualquer subtração.

Esta observação é reforçada porque os géis hidrossolúveis preparados com FBE, FE e UFE apresentaram maior captação de radicais DPPH, e os géis preparados com FBE, FE, RFE, RFW, OFE e OFW tiveram maior poder redutor do que as formulações comerciais (DPPH (%): A-  $26 \pm 2$ ; B-  $12 \pm 1$ ; C-  $2,1 \pm 0,4$ ; poder redutor (Abs<sub>690 nm</sub>): A-  $0,22 \pm 0,01$ ; B-  $0,21 \pm 0,01$ ; C-  $0,20 \pm 0,01$ ).



**Figura 14.** Conteúdo em fenóis e flavonóides totais nos preparados de géis hidrossolúveis (com incorporação de 100 µg/mL) e nos extratos isolados (100 µg/mL). FBE- extrato etanólico de botões florais; FBW- extrato aquoso de botões florais; FE- extrato etanólico de flores; FW- extrato aquoso de flores; UFE- extrato etanólico de frutos imaturos; UFW- extrato aquoso de frutos imaturos; RFE- extrato etanólico de frutos maduros; RFW- extrato aquoso de frutos maduros; ORFE- extrato etanólico de frutos em sobre maturação; ORFW- extrato aquoso de frutos em sobre maturação.

### **3.2. Atividade inibidora do crescimento de linhas celulares tumorais e não-tumorais exercida pelos extratos fenólicos**

Os efeitos dos extratos fenólicos obtidos através de quatro partes do espinheiro (botões florais, frutos imaturos, maduros e em sobre maturação) sobre o crescimento de quatro linhas celulares tumorais humanas (MCF-7, NCI-H460, Hela, HepG2), são apresentados Tabela 3, sob a forma de  $GI_{50}$  (concentração responsável por 50% de inibição do crescimento celular). Foram estas as linhas escolhidas uma vez que as mesmas se encontram bem caracterizadas e são representativas de diferentes tipos de células tumorais, com origem em diferentes tecidos.

O extrato de botões florais foi o mais eficaz em todas as linhas celulares testadas, apresentando valores de  $GI_{50}$  que variam de 63,55 a 88,45  $\mu\text{g/mL}$  para as células Hela e HepG2 respetivamente; por outro lado, o extracto com pior resultado foi o dos frutos maduros, apresentando valores de  $GI_{50}$  entre 176,75 e 318,72  $\mu\text{g/mL}$ , para as células Hela e HepG2 respetivamente. No entanto, nenhuma das amostras apresentou toxicidade nas células não tumorais testadas (PLP2), uma vez que os valores de  $GI_{50}$  obtidos foram muito mais elevados do que os valores correspondentes às linhas celulares tumorais (Tabela 3).

A elipticina é um potente agente antitumoral, cujo mecanismo de ação se considera ser baseado principalmente na intercalação do ADN e/ou a inibição da topoisomerase II (Stiborová et al., 2001), tendo sido utilizada como controlo positivo. No entanto, não se deve considerar como um padrão uma vez que se trata de um composto puro e sintético, enquanto as amostras ensaiadas foram extratos completos. Além disso, mostra uma elevada toxicidade para as células não tumorais. O resultado obtido para a amostra mais ativa de *C. monogyna* é comparável com matrizes naturais já estudadas nas mesmas linhas celulares (Vaz et al., 2012).

**Tabela 3.** Atividade inibidora do crescimento de linhas celulares tumorais e não-tumorais exercida pelos extratos fenólicos de *C. monogyna*.

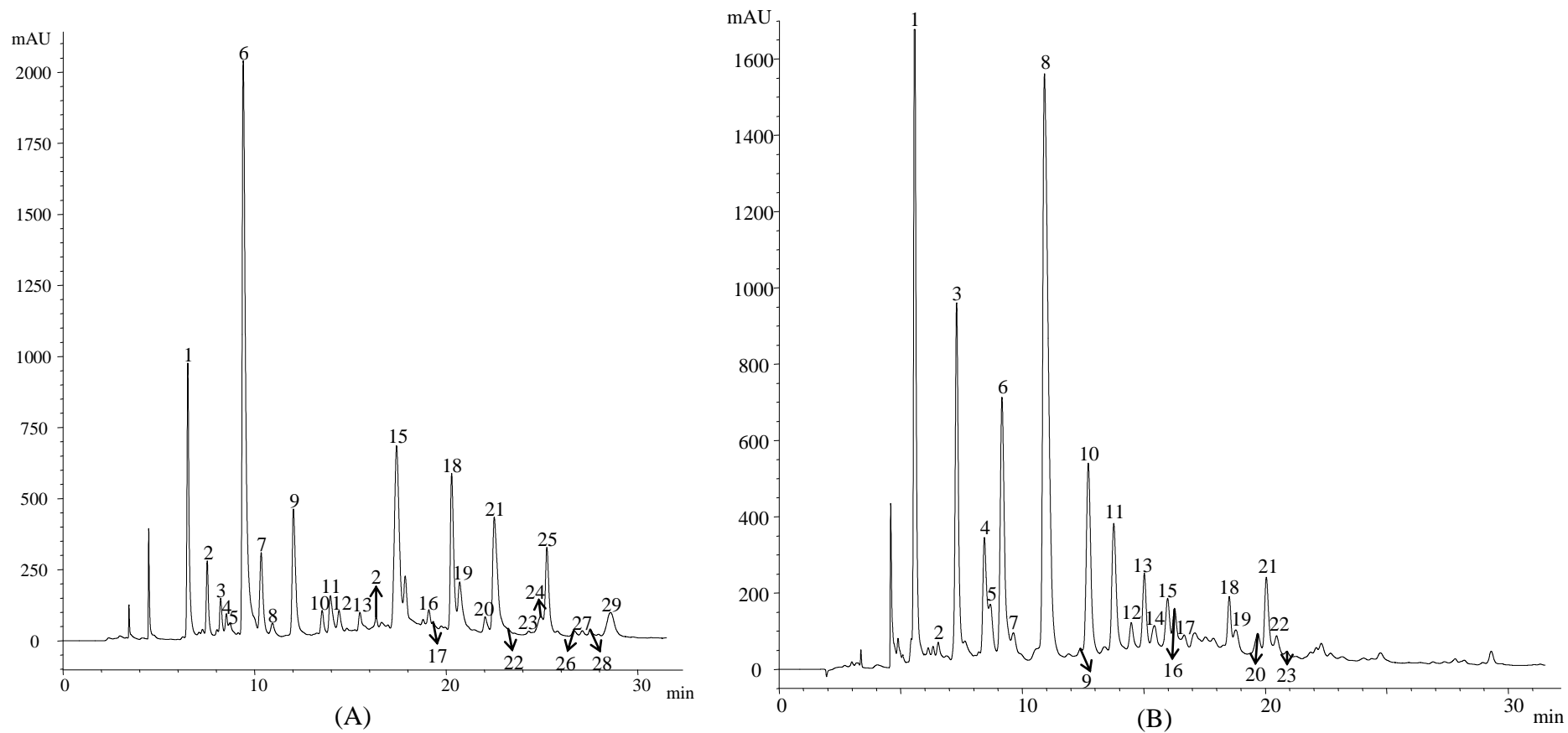
Amostra	Linhas celulares tumorais				Células não-tumorais
	MCF7 (carcinoma de mama)	NCI-H460 (carcinoma de pulmão)	HeLa (carcinoma cervical)	HepG <sub>2</sub> (carcinoma hepatocelular)	PLP2 (cultura primária de células fígado de porco)
FLB	66,96 ± 0,01 b	67,61 ± 4,29 b	63,55 ± 3,56 d	88,45 ± 8,11 b	356,60 ± 2,00
UF	82,02 ± 7,73 b	84,18 ± 7,90 b	95,76 ± 6,08 c	297,99 ± 5,79 a	>400
RF	223,53 ± 8,24 a	274,94 ± 13,56 a	176,75 ± 9,84 b	318,72 ± 4,87 a	>400
ORF	219,44 ± 9,19 a	277,89 ± 9,23 a	228,61 ± 3,54 a	282,00 ± 13,68 a	>400
Elíptica	1,42 ± 0,18	1,06 ± 0,15	0,81 ± 0,06	1,21 ± 0,20	1,98±0,06

Os resultados são expressos em valores de GI<sub>50</sub> (concentração de extracto em µg/mL responsável por 50% de inibição de crescimento celular). Em cada coluna, letras diferentes correspondem a diferenças estatisticamente significativas entre os resultados ( $p < 0.05$ ). FLB- botões florais; UF- frutos imaturos; RF- frutos maduros; ORF- frutos em sobre maturação.

### 3.3. Caracterização química dos extratos fenólicos

A caracterização dos compostos fenólicos presentes nos extratos foi efetuada por cromatografia e espectrometria de massa (HPLC-DAD-MS). A título exemplificativo, apresenta-se na Figura 15 o perfil cromatográfico dos botões florais (A) e dos frutos imaturos de *C. monogyna* (B), registados a 280. A separação de alguns compostos minoritários não foi completamente efetiva, impedindo a sua quantificação.

Os resultados relativos aos tempos de retenção, comprimentos de onda máximos ( $\lambda_{\max}$ ), iões pseudomoleculares, fragmentos iónicos  $MS^2$  maioritários, tentativa de identificação e concentração de ácidos fenólicos, flavonóides e antocianinas apresentam-se nas Tabelas 4-6.



**Figura 15.** Cromatogramas de HPLC dos compostos fenólicos dos botões florais (A) e dos frutos imaturos (B) de *C. monogyna*, registados a 280 nm.

**Tabela 4.** Parâmetros cromatográficos do perfil em compostos fenólicos dos extratos de botões florais de *C. monogyna*. Rt- tempo de retenção;  $\lambda_{\max}$ - comprimento de onda de absorção máxima.

Pico	Rt (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Íon Pseudomolecular [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/g, dw)
<b>Botão floral</b>						
1	6,5	326	353	191 (100), 179 (80), 173 (15), 161 (16), 135 (87)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	1,58 ± 0,07
2	7,5	328	391	217 (100), 179 (44), 173 (16), 135 (44)	Derivado do ácido cafeico	0,45 ± 0,02
3	8,2	312	337	191 (100), 173 (8), 163 (69), 155 (3), 119 (49)	Ácido 3- <i>p</i> -cumaroilquínico	0,07 ± 0,00
4	8,5	330	353	191 (58), 179 (80), 173 (100), 161 (7), 135 (63)	Ácido 4- <i>O</i> -cafeoilquínico	0,17 ± 0,02
5	8,7	328	391	217 (100), 179 (61), 173 (14), 161 (3), 135 (37)	Derivado do ácido cafeico	0,11 ± 0,00
6	9,4	326	353	191 (100), 179 (5), 173 (10), 161 (11), 135 (2)	Ácido 5- <i>O</i> -cafeoilquínico	5,41 ± 0,01
7	10,4	314	-	163 (30), 119 (100)	Derivado do ácido <i>p</i> -cumárico	0,20 ± 0,07
8	11,0	314	337	191 (100), 173 (47), 163 (29)	Ácido <i>cis</i> -5- <i>p</i> -cumaroilquínico	0,02 ± 0,00
9	12,0	280	289	245 (100), 205 (62), 151 (38), 137 (47)	(-)-Epicatequina	2,32 ± 0,08
10	13,5	278	865	865 (51), 739 (6), 713 (6), 695 (15), 577 (28), 575 (9), 425 (33), 407 (100), 289 (48), 287 (7)	Trímero de procianidina	0,37 ± 0,01
11	14,0	314	337	191 (100), 173 (6), 163 (12), 119 (6)	Ácido <i>trans</i> -5- <i>p</i> -cumaroilquínico	0,12 ± 0,00
12	14,4	278	1153	865 (6), 577 (6), 575 (6), 561 (100), 289 (53)	Tetrâmero de procianidina	0,43 ± 0,06
13	15,5	328	367	193 (6), 191 (100), 173 (4), 134 (9)	Ácido 5-feruloilquínico	0,10 ± 0,01
14	16,4	280	849	679 (11), 559 (36), 289 (21), 271 (5)	Trímero de proantocianidina ((epi)afzelequina + (epi)catequina)	0,13 ± 0,01
15	17,4	338	577	457 (2), 413 (50), 341 (4), 311 (19), 293 (100)	2''- <i>O</i> -ramnosil- <i>C</i> -hexosil-apigenina	4,33 ± 0,04
16	19,1	354	609	301 (100)	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinósido	0,33 ± 0,01
17	19,3	356	609	301 (100)	Quercetina-ramnosil-hexósido	0,16 ± 0,00
18	20,3	356	463	301 (100)	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido	3,24 ± 0,05
19	20,7	352	463	301 (100)	Quercetina-hexósido	1,11 ± 0,00

Pico	Rt (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Ião Pseudomolecular [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/g, dw)
20	22,0	354	505	463 (28), 301 (100)	Quercetina-acetil-hexósido	0,30 ± 0,01
21	22,5	328	515	353 (100), 335 (6), 191 (87), 179 (42), 173 (12), 135 (50)	Ácido 3,5- <i>O</i> -dicafeoilquínico	1,41 ± 0,05
22	23,1	356	433	301 (19)	Quercetina-pentósido	0,05 ± 0,01
23	24,3	352	447	285 (50)	Kaempferol-3- <i>O</i> -glucósido	0,04 ± 0,01
24	24,9	342	619	499 (4), 413 (69), 293 (100)	2''- <i>O</i> -ramnosil- <i>C</i> -acetil-hexosil-apigenina	0,40 ± 0,04
25	25,3	346	519	315 (100), 300 (74)	Isoramnetina-acetil-hexósido	0,84 ± 0,01
26	26,7	344	661	601 (47), 455 (45), 395 (32), 311 (23), 293 (100)	2''- <i>O</i> -acetilramnosil- <i>C</i> -acetil-hexosil-apigenina ou 2''- <i>O</i> -ramnosil- <i>C</i> -diacetil-hexosil-apigenina	0,09 ± 0,05
27	27,1	312	499	353 (7), 337 (29), 191 (19), 173 (15), 179 (6), 163 (100)	Ácido cafeoil- <i>p</i> -cumaroilquínico	0,06 ± 0,02
28	27,5	316	499	353 (67), 337 (15), 191 (100), 179 (43), 173 (13), 163 (16)	Ácido cafeoil- <i>p</i> -cumaroilquínico	0,07 ± 0,02
29	28,6	340	661	601 (19), 455 (78), 311 (16), 293 (100)	2''- <i>O</i> -acetil-ramnosil- <i>C</i> -acetil-hexosil-apigenina ou 2''- <i>O</i> -ramnosil- <i>C</i> -diacetil-hexosil-apigenina	0,86 ± 0,02
<b>Ácidos fenólicos</b>						<b>9,76 ± 0,25</b>
<b>Flavonóides</b>						<b>15,02 ± 0,33</b>
<b>Compostos fenólicos</b>						<b>23,94 ± 0,59</b>

dw- massa seca.

**Tabela 5.** Parâmetros cromatográficos do perfil em compostos fenólicos de extratos de frutos de *C. monogyna*. Rt- tempo de retenção;  $\lambda_{\max}$ - comprimento de onda de absorção máxima.

Pico	Rt (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Íão Pseudomolecular [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação (mg/g, dw)		
						Frutos imaturos	Frutos maduros	Frutos em sobre maturação
1	6,5	326	353	191 (100), 179 (82), 173 (14), 161 (12), 135 (82)	Ácido 3- <i>O</i> -cafeoilquínico	1,48 ± 0,13	0,60 ± 0,02	0,49 ± 0,02
2	7,5	328	335	231 (17), 217 (100), 179 (70), 135 (24)	Derivado do ácido cafeico	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
3	8,2	312	337	191 (100), 173 (10), 163 (69), 155 (3), 119 (38)	Ácido 3- <i>p</i> -cumaroilquínico	0,32 ± 0,03	0,12 ± 0,00	0,12 ± 0,01
4	8,4	326	391	391 (100), 217 (57), 179 (57), 135 (43)	Derivado do ácido cafeico	0,36 ± 0,03	0,14 ± 0,01	0,38 ± 0,03
5	9,5	278	865	739 (8), 713 (8), 695 (22), 577 (35), 575 (15), 425 (31), 407 (100), 289 (42), 287 (87)	Trímero de procianidina	0,30 ± 0,04	0,28 ± 0,03	0,29 ± 0,03
6	10,0	280	577	451 (38), 425 (67), 407 (100), 289 (76), 287 (20)	Dímero de procianidina	1,74 ± 0,13	1,27 ± 0,03	1,71 ± 0,07
7	10,4	278	1153	865 (22), 713 (4), 577 (33), 575 (16), 561 (20), 289 (100)	Tetrâmero de procianidina	0,19 ± 0,06	0,15 ± 0,01	0,13 ± 0,02
8	12,0	278	289	137 (43)	(-)-Epicatequina	5,19 ± 0,59	1,84 ± 0,09	2,98 ± 0,07
9	13,2	278	863	863 (100), 711 (26), 573 (16), 451 (18), 411 (30), 289 (16), 285 (12)	Trímero de procianidina com uma ligação do tipo-A	0,05 ± 0,00	nd	0,13 ± 0,01
10	13,5	280	865	739 (18), 713 (18), 695 (22), 577 (35), 575 (22), 425 (21), 407 (100), 289 (42), 287 (87)	Trímero de procianidina	1,44 ± 0,10	0,75 ± 0,02	0,79 ± 0,01
11	14,4	280	1153	865 (11), 713 (5), 577 (30), 575 (22), 561 (30), 289 (100)	Tetrâmero de procianidina	0,93 ± 0,02	0,38 ± 0,04	0,31 ± 0,03
12	15,3	280	865	739 (6), 713 (11), 695 (11), 577 (16), 575 (24), 425 (11), 407 (100), 289 (8), 287 (28)	Trímero de procianidina	0,19 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,12 ± 0,01
13	15,8	280	1153	865 (20), 577 (27), 575 (16), 561 (7), 289 (100)	Tetrâmero de procianidina	0,45 ± 0,11	0,14 ± 0,01	0,08 ± 0,00
14	16,2	280	865	577 (45), 287 (100)	Trímero de procianidina	0,18 ± 0,08	0,11 ± 0,01	0,06 ± 0,00
15	16,8	280	865	739 (10), 695 (7), 577 (42), 575 (28), 425 (10), 289 (58), 287 (72)	Trímero de procianidina	0,33 ± 0,07	0,10 ± 0,01	0,04 ± 0,01

16	17,1	280	1153	289 (100)	Tetrâmero de procianidina	0,29 ± 0,05	0,09 ± 0,00	0,09 ± 0,02
17	17,5	280	1153	865 (36), 713 (7), 577 (21), 575 (32), 561 (7), 289 (100)	Tetrâmero de procianidina	0,13 ± 0,02	0,04 ± 0,00	0,08 ± 0,01
18	18,5	280	577	451 (27), 425 (57), 407 (100), 289 (73), 287 (15)	Dímero de procianidina	0,32 ± 0,03	0,19 ± 0,05	0,21 ± 0,01
19	19,1	356	609	301 (100)	Quercetina-3- <i>O</i> -rutinosídeo	0,05 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,05 ± 0,00
20	20,3	355	463	301 (100)	Quercetina-3- <i>O</i> -glucósido	0,59 ± 0,06	0,51 ± 0,02	0,37 ± 0,01
21	20,7	354	463	301 (100)	Quercetina-hexósido	0,16 ± 0,01	0,21 ± 0,01	0,13 ± 0,01
22	22,0	354	505	463 (26), 301 (100)	Quercetina-acetil-hexósido	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,07 ± 0,00
23	22,5	330	515	353 (100), 191 (64), 179 (37), 173 (4), 135 (17)	Ácido-3,5-dicafeoilquínico	0,05 ± 0,01	nd	nd
					<b>Ácidos fenólicos</b>	<b>2,25 ± 0,17</b>	<b>0,89 ± 0,00</b>	<b>1,00 ± 0,05</b>
					<b>Flavonóides</b>	<b>12,77 ± 1,24</b>	<b>6,19 ± 0,34</b>	<b>8,28 ± 0,16</b>
					<b>Compostos fenólicos</b>	<b>15,02 ± 1,42</b>	<b>7,07 ± 0,34</b>	<b>9,29 ± 0,22</b>

dw- massa seca.

nd- não detetado.

**Tabela 6.** Parâmetros cromatográficos do perfil em antocianinas de extratos de frutos de *C. monogyna*. Rt- tempo de retenção;  $\lambda_{\max}$ - comprimento de onda de absorção máxima.

Pico	Rt (min)	$\lambda_{\max}$ (nm)	Íão Pseudomolecular [M-H] <sup>-</sup> (m/z)	MS <sup>2</sup> (m/z)	Tentativa de identificação	Quantificação (ng/g, dw)		
						Frutos imaturos	Frutos maduros	Frutos em sobre maturação
1	20,9	516	449	287	Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido	30,32 ± 1,16	483,89 ± 24,61	4.052,01 ± 141,71
2	22,7	518	595	449, 287	Cianidina-3- <i>O</i> -rutinósido	nd	10,12 ± 0,55	78,72 ± 6,27
3	24,9	502	433	271	Pelargonidina-3- <i>O</i> -glucósido	nd	1,03 ± 0,01	5,13 ± 0,26
4	25,6	518	419	287	Cianidina-3- <i>O</i> -pentósido	nd	15,76 ± 0,21	131,55 ± 6,71
5	27,8	516	463	301	Peonidina-3- <i>O</i> -glucósido	0,23 ± 0,01	0,48 ± 0,04	7,41 ± 0,22
<b>Antocianinas totais</b>						<b>30,55 ± 1,17</b>	<b>511,28 ± 25,35</b>	<b>4.274,83 ± 155,18</b>

dw- massa seca.

nd- não detetado.

### 3.3.1. Ácidos fenólicos e derivados

Os ácidos fenólicos identificados correspondem a derivados de ácidos hidroxinâmicos, nomeadamente ácidos clorogénicos, uma família de ésteres formada a partir do ácido cinâmico, e, com mais frequência, do ácido cafeico, do ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico e ácido quínico (IUPAC, 1976). De acordo com os seus espetros de UV ( $\lambda_{\text{max}} = 314\text{-}330\text{ nm}$ ) e iões pseudomoleculares  $[\text{M-H}]^-$  ( $m/z$  de 353, 337, 367, 515 e 499, todos eles produzindo um ião com  $m/z$  191, do ácido quínico desprotonado), foram detetados 10 compostos nos botões florais (picos 1, 3, 4, 6, 8, 11, 13, 21, 27 e 28, Tabela 4) e 3 compostos nos frutos, (picos 1, 3 e 23, na Tabela 5), identificados como derivados do ácido cinamoilquínico, contendo uma ou duas unidades de ácido cafeico, ácido *p*-cumárico ou de ácido ferúlico.

A atribuição dos diferentes picos a isómeros do ácido hidroxicinamoilquínico foi feita utilizando o sistema de numeração recomendado pela IUPAC (IUPAC, 1976) e as chaves hierárquicas anteriormente desenvolvidas por Clifford et al. (2003, 2005). O composto fenólico mais importante encontrado nos botões florais correspondeu ao pico 6, sendo este identificado como ácido-5-*O*-cafeoilquínico por comparação com o padrão. Os picos 1 e 3 dos botões florais e dos frutos, foram identificados como ácido 3-*O*-cafeoilquínico e ácido 3-*p*-cumaroilquínico respetivamente, devido ao ácido quínico desprotonado ( $m/z$  191) como pico de base e outro ião  $m/z$  179 [ácido cafeico- $\text{H}]^-$  ou  $m/z$  163 [ácido *p*-cumárico- $\text{H}]^-$ ], apresentando uma intensidade superior a 50%, em comparação com o pico de base, um padrão característico dos ácidos 3-acilclorogénicos (Clifford et al., 2003, 2005).

O pico 4 nos botões florais foi facilmente distinguido pelo seu pico de base a  $m/z$  173 ([ácido quínico- $\text{H-H}_2\text{O}]^-$ ), acompanhado por um fragmento secundário com  $m/z$  179, com aproximadamente 80% de abundância, o qual permitiu a sua identificação como ácido 4-*O*-cafeoilquínico de acordo com os padrões de fragmentação descritos por Clifford et al. (2003, 2005). Os picos 8 e 11 foram identificados como os isómeros *cis* e *trans* do ácido 5-*p*-cumaroilquínico com base na sua fragmentação. Estes dois compostos já tinham sido identificadas em flores de *C. monogyna* (Barros et al., 2012). Do mesmo modo, o pico 13, foi tentativamente identificado como ácido 5-*o*-feruloilquínico.

O pico 21 dos botões florais e o pico 23 dos frutos (com ião pseudomolecular  $[M-H]^-$  de  $m/z$  515) foram designados como ácido 3,5-*O*-dicafeoilquínico, com base no seu padrão de fragmentação e abundâncias relativas dos fragmentos (Clifford et al., 2003, 2005). O pico  $MS^2$  de  $m/z$  353 foi produzido pela perda de uma das unidades cafeoil  $[M-H\text{-cafeoil}]^-$ , e a subsequente fragmentação deste ião produziu os mesmos fragmentos que o ácido 5-*o*-cafeoilquínico a  $m/z$  191, 179 e 135, embora, neste caso, com o sinal  $m/z$  179 comparativamente mais intenso  $[\text{ácido cafeico-H}]^-$  (<50% do pico de base). Os picos 27 e 28 nos botões florais apresentaram um espectro de UV semelhante e o mesmo ião pseudomolecular de  $m/z$  499 que produziu fragmentos de  $m/z$  353 ( $[\text{ácido cafeoilquínico-H}]^-$ ), 337 ( $[\text{ácido } p\text{-cumaroilquínico-H}]^-$ ), 179 e 163, correspondendo ao ácido cafeico e ácido cumárico desprotonados, respetivamente, o que permitiu que fossem identificados como dois isómeros de ácido cafeoil-*p*-cumaroilquínico.

Os picos 2 e 5 (mesmo ião pseudomolecular  $[M-H]^-$  de  $m/z$  391) nos botões florais foram identificados como derivados do ácido cafeico pelo espectro UV semelhante ao do ácido cafeico com  $\lambda_{\text{max}}$  a 328 nm e um fragmento  $MS^2$   $m/z$  179 ( $[\text{ácido cafeico-H}]^-$ ). Estes compostos não puderam ser totalmente identificados. Um composto com características semelhantes foi também identificado nos frutos (pico 4, tabela 3).

O pico 7 do extrato de botões florais apresentou espectro UV semelhante ao ácido *p*-cumaroilquínico mas foi eluído após um tempo de retenção diferente. Não foi possível obter um sinal inequívoco que pudesse ser associado a um ião pseudomolecular, embora os iões de  $m/z$  163 (possível ácido *p*-cumárico desprotonado) e 119 (perda de um grupo carboxilo adicional), foram observados no seu tempo de retenção utilizando detecção ESI. Assim, este pico foi associado a um derivado do ácido *p*-cumárico.

De salientar que os ácidos fenólicos, tais como os derivados de ácido gálico e cafeico mostraram efeito antiproliferativo em células HeLa, adenocarcinoma do colo do útero, cancro da mama e linhas celulares leucémicas (Gomes et al., 2003). Além disso, foi demonstrado que o tratamento de células de cancro humano da mama (MCF-7 e MAD-MB-231), com ácido cafeico ou ácido clorogénico, inibiu parcialmente a metilação da região promotora do gene *RaRb* (De et al., 2011).

### 3.3.2. Flavonóis

Em todas as amostras estudadas, os derivados de quercetina ( $\lambda_{\max}$  próximo de 354 nm, e um fragmento  $MS^2$  de  $m/z$  301) foram particularmente abundantes. A quercetina-3-*O*-rutinósido e a quercetina-3-*O*-glucósido foram encontradas nos extratos de botões florais (picos 16 e 18, Tabela 4) e nos frutos (picos 19 e 20, Tabela 5). Ambos foram positivamente identificados de acordo com as suas características de massa, tempo de retenção e espectro de UV-vis, por comparação com padrões comerciais. Outros glucósidos de quercetina detetados foram o pico 20 no extrato de botões florais e o pico 22 nos frutos, que foram atribuídos a quercetina-acetil-hexósido (com ião pseudomolecular  $[M-H]^-$  com  $m/z$  505); o pico 19 nos botões florais e o pico 21 nos frutos, foram identificados como hexósidos de quercetina ( $[M-H]^-$  com  $m/z$  463); o pico 22 nos botões florais ( $[M-H]^-$  com  $m/z$  433), como quercetina-pentósido e o pico 17 ( $[M-H]^-$  a  $m/z$  609) como quercetina-ramnosil-hexósido. As identificações foram feitas a partir do ião pseudomolecular e dos espectros  $MS^2$ , libertando fragmentos correspondentes às perdas de hexosil (-162 mu), pentosilo (-132 mu), ramnosil-hexosilo (-146-162 mu) e a unidades de acetilo (-42 mu). Em nenhum dos casos foi possível identificar o açúcar ou a localização dos substituintes.

Considera-se oportuno salientar que a quercetina apresenta efeitos inibitórios no crescimento de células HL-60 (linha celular humana de leucemia promielocítica), células Hela, células de cancro gástrico (HGC-27, NUGC-2, MKN-7 e MKN-28), células de cancro do cólon (COLO 320 DM), células humanas de cancro de mama (MCF-7), células de gliossarcoma, células do cancro do ovário, cancro humano epidermoidal (A431), linha celular humana de cancro hepático (HepG2) e cancro pancreático (Kang, & Liang, 1997; Kandaswami et al., 2005).

Outros flavonóides detetados correspondem a derivados de kaempferol e isoramnetina. O kaempferol-3-*O*-glucósido (pico 23 do extrato de botões florais, Tabela 4) foi identificado de acordo com o tempo de retenção, espectro de massa e características UV-vis, por comparação com um padrão comercial. O pico 25 nos botões florais (ião pseudomolecular  $[M-H]^-$  com  $m/z$  519) foi identificado como isoramnetina-acetil-hexósido por perda de 204  $\mu m$  (-162-42  $\mu m$ , correspondente aos resíduos de hexosilo e acetilo), obtendo-se um ião  $MS^2$  com  $m/z$  315 (isoramnetina).

### 3.3.3. Flavonas

Nos botões florais foram também encontradas flavonas-*C*-glicosiladas. O pico 15 mostrou um ião pseudomolecular  $[M-H]^-$  com  $m/z$  577, libertando fragmentos  $MS^2$  típicos. A perda de 120  $\mu m$  (ião com  $m/z$  457  $[M-H-120]^-$ ) é característica das flavonas-*C*-hexosilo (Ferrerres et al., 2003), enquanto a perda de 164  $\mu m$ , libertando um fragmento de  $m/z$  413 ( $[M-H-146-18]^-$ ) pode ser associada a uma *O*-glicosilação no grupo hidroxilo na posição 2 do açúcar da *C*-glicosilação (Ferrerres et al., 2007). Os restantes iões com  $m/z$  341 ([aglicona + 71] $^-$ ),  $m/z$  311 ([aglicona + 41] $^-$ ) e  $m/z$  293 ([aglicona + 41-18] $^-$ ) são usuais em derivados de mono-*C*-glicosil *O*-glicosilados na posição 2'' (Ferrerres et al., 2007). De acordo com este padrão de fragmentação, o composto foi tentativamente identificado como 2-*O*-ramnosil-*C*-hexosil-apigenina. Um raciocínio semelhante foi utilizado para a atribuição dos picos 24 ( $[M-H]^-$  com  $m/z$  619), 26 e 29 ( $[M-H]^-$  com  $m/z$  661) dos botões florais com fragmentação  $MS^2$  semelhante ao pico 15, mas contendo adicionalmente um ou dois resíduos de ácido acético (42  $\mu m$ ). Assim, estes picos foram tentativamente identificado como 2-*O*-ramnosil-*C*-acetil-hexosil-apigenina (pico 24) e 2-*O*-acetilramnosil-*C*-acetil-hexosil-apigenina ou 2-*O*-ramnosil-*C*-diacetil-hexosil-apigenina (picos 26 e 29), embora na verdade o padrão de fragmentação obtido não permita concluir sobre a localização exata dos resíduos de ácido acético.

### 3.3.4. Flavan-3-óis

Os flavan-3-óis (ou seja, catequinas e proantocianidinas) foram outros flavonóides relevantes encontrados nos botões florais e, especialmente nos extratos de frutos de *C. monogyna*. O pico 9 dos botões florais e o pico 8 nos frutos, foram identificados como (-)-epicatequina, por comparação dos espectros de UV e do tempo de retenção com um padrão comercial. Os sinais a  $m/z$  577, 865 e 1153, nos botões florais (picos 10 e 12) nos frutos (picos 5-7, 10-18), respetivamente, foram associados a procianidinas do tipo B, dímeros, trímeros e tetrâmeros (isto é, unidades de (epi)catequina nas ligações interflavonóide C4-C8 ou C4-C6), enquanto o pico 14 (ião pseudomolecular  $[M-H]^-$  com  $m/z$  849) nos botões florais foi coerente com um trímero de proantocianidina, consistindo numa unidade de (epi)afzelequina e duas unidades de (epi)catequina. Além disso, o pico 9 nos extratos dos frutos mostrou um íon pseudomolecular  $[M-H]^-$  com  $m/z$  863 que poderia corresponder a um trímero de procianidina contendo duas ligações interflavonóides do tipo B e uma ligação do tipo A (isto é, C4-C8 ou C4-C6 e C2-O-C7).

### 3.3.5. Antocianinas

Os perfis de antocianinas encontradas nos frutos maduros e em sobre maturação foram bastante semelhantes, consistindo em cinco compostos diferentes, enquanto o perfil para os frutos imaturos era mais simples, com apenas duas antocianinas. As características analíticas, as identidades e as concentrações são apresentadas na Tabela 6. Os compostos cianidina-3-*O*-glucósido, pelargonidina-3-*O*-glucósido e peonidina-3-*O*-glucósido foram positivamente identificados por comparação com padrões. A identificação da cianidina-3-*O*-rutinosido também foi confirmada por comparação das características cromatográficas e espectrais (UV e massa) com dados da nossa biblioteca de compostos. O pico 4 foi identificado como cianidina-pentósido com base no seu espectro de massa, o qual revelou um sinal  $MS^2$  com  $m/z$  287 (cianidina;  $[M-132]^+$ , por perda de uma unidade de pentosilo). A cianidina-3-*O*-glucósido foi a antocianina maioritária em todas as amostras, e os extratos de frutos em sobre maturação foram, de longe, a parte botânica com as maiores concentrações de antocianinas, o que é coerente com a sua pigmentação.

Os compostos fenólicos, muito abundantes em plantas, são frequentemente relacionados com a sua bioatividade, sobretudo em resultado dos efeitos sinérgicos e/ou aditivos entre as diferentes classes de compostos presentes nos extratos (Ramful et al., 2011). Assim, a maior atividade antiproliferativa observada no extrato de botões florais pode estar relacionada com a maior concentração de compostos fenólicos encontrada nessa amostra, sobretudo de derivados de quercetina e ácidos fenólicos.

Na verdade, o potencial efeito sinérgico dos diferentes compostos fenólicos presentes nos extratos não deve ser descartado. Na verdade, as correlações lineares entre o teor de compostos fenólicos e a atividade antiproliferativa foram mais significativas quando se correlacionaram os valores de GI<sub>50</sub> com flavonóides agrupados do que para as suas classes individuais (Tabela 7) para todas as linhas de células analisadas, exceto HepG2.

**Tabela 7.** Correlações entre compostos fenólicos, flavonóides, ácidos fenólicos, flavanóis, flavonóis e procianidinas e valores GI<sub>50</sub>.

Compostos	Equação, R <sup>2</sup>			
	MCF7	NCI-H460	HeLa	HepG2
Compostos fenólicos	$y = -10,022x + 284,28$	$y = -14,068x + 371,53$	$y = -8,575x + 257,49$	$y = -13,598x + 440,93$
	0,8184 $F = 9,011; p = 0,095$	0,8028 $F = 8,140; p = 0,104$	0,7697 $F = 6,685; p = 0,123$	0,8678 $F = 13,130; p = 0,068$
Flavonóides	$y = -21,620x + 367,26$	$y = -30,475x + 489,28$	$y = -17,228x + 315,59$	$y = -21,964x + 478,74$
	0,9600 $F = 48,16; p = 0,020$	0,9497 $F = 37,74; p = 0,025$	0,7833 $F = 7,227; p = 0,115$	0,5707 $F = 2,659; p = 0,245$
Ácidos fenólicos	$y = -14,923x + 199,62$	$y = -20,844x + 252,34$	$y = -13,813x + 188,67$	$y = -26,302x + 347,01$
	0,5563 $F = 2,508; p = 0,254$	0,5404 $F = 2,351; p = 0,265$	0,6124 $F = 3,160; p = 0,217$	0,9955 $F = 441,0; p = 0,002$
Flavanóis	$y = -27,065x + 231,34$	$y = -39,968x + 300,23$	$y = -13,427x + 182,22$	$y = 20,000x + 194,37$
	0,2229 $F = 0,574; p = 0,528$	0,2301 $F = 0,598; p = 0,520$	0,0705 $F = 0,152; p = 0,735$	0,0701 $F = 0,151; p = 0,735$
Flavonóis	$y = -24,312x + 195,69$	$y = -33,737x + 246,41$	$y = -23,146x + 186,29$	$y = -51,057x + 356,20$
	0,3896 $F = 1,276; p = 0,376$	0,3735 $F = 1,192; p = 0,389$	0,4536 $F = 1,661; p = 0,326$	0,9896 $F = 190,8; p = 0,005$
Procianidinas	$y = 1,4884x + 142,15$	$y = 1,3634x + 175,18$	$y = 5,7604x + 119,69$	$y = 35,999x + 123,66$
	0,0016 $F = 0,003; p = 0,960$	0,0007 $F = 0,001; p = 0,974$	0,0312 $F = 0,064; p = 0,823$	0,5465 $F = 2,410; p = 0,261$

#### IV. Conclusões e perspetivas

Com a realização deste trabalho:

i) Avaliou-se a atividade antioxidante de cinco partes de *C. monoyna* (botões florais, flores, frutos imaturos, frutos maduros e frutos em sobre maturação- extratos etanólicos e aquosos) incorporadas em hidrogéis. A extração foi realizada com solventes de baixa toxicidade uma vez que era para posterior incorporação dos extratos numa formulação para uso tópico.

ii) Avaliou-se a atividade antiproliferativa e caracterizou-se quimicamente os extratos fenólicos de quatro dessas partes (botões florais, frutos imaturos, frutos maduros e frutos em sobre maturação). As flores já tinham sido caracterizadas num trabalho anterior da equipa de investigação onde se inseriu este trabalho (Barros et al., 2012).

As partes com maior atividade captadora de radicais DPPH foram os botões florais e os frutos imaturos, já no caso do ensaio do poder redutor a maior atividade foi apresentada pelo extrato etanólico que continha s botões florais; no ensaio de inibição da descoloração do  $\beta$ -caroteno os extratos aquosos de frutos imaturos e flores apresentaram a maior atividade e, por fim, o extrato etanólico de frutos imaturos apresentou uma maior atividade no ensaio de inibição da formação de TBARS.

Após os extratos serem incorporados no hidrogel alguns apresentaram atividade muito próxima; no caso do gel com os extratos aquosos, os valores são sobrepostos com os valores obtidos para o extrato isolado (ensaio DPPH) e o gel contendo extratos etanólicos apresentou valores superiores aos obtidos nos extratos isolados (ensaio TBARS).

No que diz respeito à atividade antiproliferativa, os extratos contendo botões florais apresentaram maior atividade, podendo isto estar relacionado com o maior conteúdo em compostos fenólicos. Nenhum extrato apresentou toxicidade para células não tumorais.

As diferentes partes revelaram um predomínio de flavonóides entre os compostos fenólicos. Estes compostos são conhecidos por terem um papel importante na inibição e progressão de desenvolvimento de diferentes tipos de cancro, bem como da proliferação celular, apoptose e diferenciação celular.

Em suma, a espécie *Crataegus monogyna* apresentou uma boa bioatividade podendo ser assim uma mais valia para incorporação em formulações farmacêuticas. No futuro, poder-se-ão efetuar estudos para otimizar a viscosidade, extrudabilidade e facilidade de dispersão dos géis preparados. Será também importante avaliar o potencial para causar reações alérgicas, o que pode ser feito utilizando diferentes técnicas como a avaliação de perda de água transepidermal ou a medição de eritemas. Podendo ainda proceder-se ao estudo das propriedades físicas tais como cor e viscosidade.

### **Este trabalho deu origem a:**

#### **Duas publicações científicas:**

- Sandra Rodrigues, Ricardo C. Calhela, João C.M. Barreira, Montserrat Dueñas, Ana Maria Carvalho, Rui M.V. Abreu, Celestino Santos-Buelga, Isabel C.F.R. Ferreira\*. *Crataegus monogyna* flowers and fruits phenolic extracts: growth inhibitory activity on human tumour cell lines and chemical characterization by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Research International*, 2012, 49, 516-523.
- João C.M. Barreira, Sandra Rodrigues, Ana Maria Carvalho, Isabel C.F.R. Ferreira\*. Development of hydrosoluble gels with *Crataegus monogyna* extracts for topical application: evaluation of antioxidant activity of the final formulations. *Industrial Crops and Products*, 2013, 42, 175-180. IF 2,507.

#### **Uma publicação em ata de congresso:**

- Sandra Rodrigues, João C.M. Barreira, Ana Maria Carvalho, Isabel C.F.R. Ferreira. Flores e frutos imaturos de *Crataegus monogyna* revelam elevado potencial antioxidante. 11º Encontro Nacional de Química dos Alimentos, 16 a 19 de Setembro de 2012, Bragança, Portugal.

#### **Uma comunicação oral:**

- João C.M. Barreira, Sandra Rodrigues, Ana Maria Carvalho, Isabel C.F.R. Ferreira. Development of paraben-free hydrogel based on plant extracts for topical application. 1<sup>st</sup> Symposium on Medicinal Chemistry of University of Minho. 17 de Maio de 2013, Braga, Portugal; OC-1; 13p.

**Três comunicações em painel:**

- Sandra Rodrigues, João C.M. Barreira, Ana Maria Carvalho, Isabel C.F.R. Ferreira. Flores e frutos imaturos de *Crataegus monogyna* revelam elevado potencial antioxidante. 11º Encontro Nacional de Química dos Alimentos, 16 a 19 de Setembro de 2012, Bragança, Portugal, CP162, 212p.
- João C.M. Barreira, Sandra Rodrigues, Montserrat Dueñas, Ana Maria Carvalho, Celestino Santos-Buelga, Isabel C.F.R. Ferreira. Anthocyanin profiles of *Crataegus monogyna* Jacq. fruits in different maturity stages. 7th International Workshop on Anthocyanins. 9th-11th September, 2013, Porto, Portugal. P47, 105p.
- João C.M. Barreira, Rui M.V. Abreu, Sandra Rodrigues, Ana Maria Carvalho, Isabel C.F.R. Ferreira. Evaluation of growth inhibitory activity of *Crataegus monogyna* Jacq. flower bud extracts against human tumor cell lines 1<sup>st</sup> Symposium on Medicinal Chemistry of University of Minho. 17 de Maio de 2013, Braga, Portugal; PC-7; 24p.

Estes documentos apresentam-se em ANEXO.

## V. Bibliografia

- Abdullah, D., Turker, M., & Konczak, I. (2012). Antioxidant capacity and phenolic constituents of *Malva neglecta* Wallr. and *Plantago lanceolata* L. from Eastern Anatolia Region of Turkey. *Journal of Herbal Medicine*, 2, 42-51.
- Abreu, R.M.V., Ferreira, I.C.F.R., Calhelha, R.C., Lima, R.T., Vasconcelos, M.H., & Adegas, F. (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.
- Almeida, V.L., Leitão, A., Reina, L.C.B., Montanari, C.A., & Donnici, C.L. (2005). Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não específicos que interagem com o DNA: uma introdução. *Quimica Nova*, 28, 118-129.
- Amarowicz, R., Pegg, R.B., Rahimi-Moghaddam, P., Barl, B., & Weil, J.A. (2004). Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*, 84, 551-562.
- Amexis, G., Ridge, J., Cervenakova, L., Enterline, J.C., Chumakov, K.M., & Asher, D.M. (2003). Stability of the prion protein-encoding (PRNP) gene in HeLa cells. *Biologicals*, 31, 83-86.
- Antolovich, M., Prenzler, P.D., Patsalides, E., McDonald, S., & Robards, K. (2002). Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 127, 183-198.
- Barros, L., Carvalho, A.M., & Ferreira, I.C.F.R. (2011). Comparing the composition and bioactivity of *Crataegus monogyna* flowers and fruits used in folk medicine. *Phytochemical Analysis*, 181-188.
- Barros, L., Oliveira, S., Carvalho, A.M., & Ferreira, I.C.F.R. (2010). In vitro antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine. *Industrial Crops and Products*, 32, 572-578.
- Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A.M., & Ferreira, I.C.F.R., (2010a). Lamiaceae often used in Portuguese folk medicine as a source of powerful antioxidants: vitamins and phenolics. *LWT: Food Science and Technology*, 43, 544-550.

- Barros, L., Carvalho, A.M., & Ferreira, I.C.F.R., (2010b). Leaves, flowers, immature fruits and leafy flowered stems of *Malva sylvestris*: a comparative study of the nutraceutical potential and composition. *Food and Chemical Toxicology*, *48*, 1466-1472.
- Barros, L., Carvalho, A.M., Sá Morais, J., Ferreira, I.C.F.R. (2010c). 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.
- Bate-Smith, E.C. (1954). Astringency in foods. *Food*, *23*, 124.
- Braca, A., De Tommasi, N., Bari, L.D., Pizza, C., Politi, M., & Morelli, I. (2001). Antioxidant principles from *Bauhinia tarapotensis*. *Journal of Natural Products*, *64*, 892-895.
- Braca, A., Sortino, C., Politi, M., Morelli, I., & Mendez, J. (2002). Antioxidant activity of flavonoids from *Licania licaniaeflora*. *Journal of Ethnopharmacology*, *79*, 379-381.
- Bougatef, A., Hajji, M., Balti, R., Lassoued, I., Triki-Ellouz, Y., & Nasri, M. (2008). Antioxidant and free radical-scavenging activities of smooth hound (*Mustelus mustelus*) muscle protein hydrolysates obtained by gastrointestinal proteases. *Food Chemistry*, *114*, 1198-1205.
- Camejo-Rodrigues, J.S., Ascensão, L., Bonet, M.À., & Vallès, J. (2003). An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of Serra de S. Mamede (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, *89*, 199-209.
- Carocho, M., & Ferreira, I.C.F.R. (2013). A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food and Chemical Toxicology*, *51*, 15-25.
- Carvalho, A.M., (2010). Plantas y sabiduría popular del Parque Natural de Montesinho. Un estudio etnobotánico en Portugal. Biblioteca de Ciencias 35. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid.
- Castroviejo, S. (coord), 2001. Flora Iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares. Rosaceae, vol. VI. Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid.

- Chen, Y., Zhang, J., Yanping, W., Zhang, L., Julien, R., Kumcheong, T., & Balasubramanian, N. (2008). Real-time monitoring approach: Assessment of effects of antibodies on the adhesion of NCI-H460 cancer cells to the extracellular matrix. *Biosensors and Bioelectronics*, *23*, 1390-1396.
- Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., & Kuhnert, N.A. (2003). A hierarchical scheme for LC-MS<sup>n</sup> 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 LCMS<sup>n</sup>. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *53*, 3821-3832.
- D'Ambrosio, M., S. (2007). Phytonutrients: A more natural approach toward cancer prevention. *Seminars in Cancer Biology*, *17*, 345-346.
- De, P., Baltas, M., & Bedos-Belval, F. (2011). Cinnamic acid derivatives as anticancer agents - A review. *Current Medicinal Chemistry*, *18*, 1672-1703.
- Feliciano, S.A., Pérez, L.A., Olmo, E., Martínez, C.J., Pérez, C., Jiménez, C., & Ravelo, G.A. (2008). Manual de determinación estructural de compuestos naturales. Organización del Convenio Andrés Bello.
- Ferreira, I.C.F.R., Barros L., & Abreu, R.M.V. (2009). Antioxidants in wild mushrooms. *Current Medicinal Chemistry*, *16*, 1543-1560.
- Ferreres, F., Gil-Izquierdo, A., Andrade, P.B., Valentão, P., & Tomás-Barberán, F.A. (2007). Characterization of C-glycosyl flavones O-glycosylated by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, *1161*, 214-223.
- Ferreres, F., Silva, B.M., Andrade, P.B., Seabra, R.M., & Ferreira, M.A. (2003). Approach to the study of C-glycosyl flavones by ion trap HPLC-PAD-ESI/MS/MS: Application to seeds of quince (*Cydonia oblonga*). *Phytochemical Analysis*, *14*, 352-359.
- Fraga, G.C., Galleano, M., Verstraeten, V.S. & Oteiza, I.P. (2010). Basic biochemical mechanisms behind the health benefits of polyphenols. *Molecular Aspects of Medicine*, *31*, 435-445.
- Froehlicher, T., Hennebelle, T., Martin-Nizard, F., Cleenewerck, P., Hilbert, J.-L., & Trotin, F. (2009). Phenolic profiles and antioxidative effects of hawthorn cell suspensions, fresh fruits, and medicinal dried parts. *Food Chemistry*, *115*, 897-903.

- 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 comaceration of Tempranillo and Graciano varieties. *Analytica Chimica Acta*, 660, 134-142.
- Ghiselli, A., Serafini, M., Natella, F., & Scaccini, C. (2000). Total antioxidante capacity as a tool to assess redox status: critical view experimental data. *Free Radical Biology & Medicine*, 29, 1106-1114.
- Gomes, C.A., Cruz, T.G., Andrade, J.L., Milhazes, N., Borges, F., & Marques, M.P.M. (2003). Anticancer activity of phenolic acids of natural or synthetic origin: A structure-activity study. *Journal of Medicinal Chemistry*, 46, 5395-5401.
- Goffon, J.P., & Brun, M. (1991). High-Performance liquid chromatography of red fruit anthocyanins. *Journal of Chromatography A*, 537,101-121.
- Guan, Y.Q., Zheng, Z., Li, Z., & Liu, J.M. (2012). Cell death in HeLa mediated by thermoplastic polyurethane with co-immobilized IFN- $\gamma$  plus TNF- $\alpha$ . *Acta Biomaterialia*, 8, 1348-1356.
- Guimarães, R., Barreira, J.C.M., Barros, L., Carvalho, A.M., & Ferreira, I.C.F.R. (2011). Effects of oral dosage form and storage period on the antioxidant properties of four species used in traditional herbal medicine. *Phytotherapy Research*, 25, 484-492.
- Guarrera, M.P. & Savo, V. (2013). Perceived health properties of wild and cultivated food plants in local and popular traditions of Italy: A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 146, 659-680.
- Graf, E. (1992). Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 13, 435-448.
- Haneefa, M.K.P., Hanan, S.K., Saraswathi, R., Prasad, G.M., & Chandini, N. (2010). For-mulation and evaluation of herbal gel of *Pothos scandens* Linn. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 3, 988-992.
- Herrmann, K. (1976). Flavonols and flavones in food plants: a review. *Journal of Food Technology*, 11, 433-448.
- Huang, D., Ou, B., & Prior, R.L. (2005). The chemistry behind antioxidant capacity assays. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 1841-1856.
- IUPAC (1976). Nomenclature of cyclitols. *Biochemical Journal*, 153, 23-31.
- Jamison, R., Jennifer (2003). Chapter 85- Phytochemicals (Phytonutrients). *Clinical Guide to Nutrition & Dietary Supplements in Disease Management*. 615-618.

- Kandaswami, C., Lee, L.T., Lee, P.P., Hwang, J.J., Ke, F.C., & Huang, Y.T. (2005). The antitumor activities of flavonoids. *In Vivo*, *19*, 895-909.
- Kandaswami, C., Perkins, E., Soloniuk, D.S., Drzewiecki, G., & Middleton, E., Jr. (1991). Antiproliferative effects of citrus flavonoids on a human squamous cell carcinoma *in vitro*. *Cancer Letters*, *56*, 147-152.
- Kang, T.B. & Liang, N.C. (1997). Studies on the inhibitory effects of quercetin on the growth of HL-60 leukemia cells. *Biochemical Pharmacology*, *54*, 1013-1018.
- Karadag, A., Ozcelik, B., & Saner, S. (2009). Review of methods to determine antioxidant capacities. *Food Analytical Methods*, *2*, 41-60.
- Karthikeyan, S., Prasad, N.R., Ganamani, A., & Balamurugan, E. (2012). Anticancer activity of resveratrol-loaded nanoparticles of gelatin in NCI-H460 non-small cell lung cancer cell. *Biomedicine and Preventive Nutrition*, *3*, 64-73.
- Kaur, I.P., Kapila, M., & Agrawal, R. (2007). Role of new systems for the development of topical antioxidants as therapeutic agents to combat photoageing. *Ageing Research Reviews*, *6*, 271-288.
- Kim, M.H. (2003). Flavonoids inhibit VEGF/ $\beta$ FGF-induced angiogenesis *in vitro* by inhibiting the matrix-degrading proteases. *Journal of Cellular Biochemistry*, *89*, 529-538.
- Kohen, R., & Nyska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. *Toxicology and Pathology*, *30*, 620-650.
- Lee, L.T., Huang, Y.T., Hwang, J.J., Lee, H.P.P., Ke, F.C., & Nair, M.P. (2002). Blockade of the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase activity by quercetin and luteolin leads to growth inhibition and apoptosis of pancreatic tumor cells. *Anticancer Research*, *22*, 1615-1628.
- Lee, H.J., Park, H.K., Lee, M., Kim, H., Seo, D.W., Kim, Y.J., Baek, I., Jang, S.D. & Ha, J.T. (2013) Identification, characterisation, and quantification of phenolic compounds in the antioxidant activity-containing fraction from the seeds of Korean perilla (*Perilla frutescens*) cultivars. *Food Chemistry*, *136*, 843-852.
- Lima, C.F., Fernandes-Ferreira, M., & Pereira-Wilson, C. (2006). Phenolic compounds protect HepG2 cells from oxidative damage: Relevance of glutathione levels. *Life sciences*, *79*, 2056-2068.
- Liu, P., Kallio, H., Lü, D., Zhou, C., & Yang, B. (2011). Quantitative analysis of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus* spp.) fruits by high

- performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 127, 1370-1377.
- Liu, P., Yang, B., & Kallio, H. (2010). Characterization of phenolic compounds in Chinese hawthorn (*Crataegus pinnatifida* Bge. var. major) fruit by high performance liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *Food Chemistry*, 121, 1188-1197.
- López, V., Akerreta, S., Cavero, R.Y., & Calvo, M.I. (2007). Actividad antioxidante de plantas empleadas en la medicina tradicional navarra. *Revista de Fitoterapia*, 7, 43-47.
- López-Lázaro, M. (2002). Flavonoids as anticancer agents: Structure-activity relationship study. *Current Medicinal Chemistry. Anti-Cancer Agents*, 2, 691-714.
- Magalhães, L.M., Segundo, M.A., Reis, S., & Lima, J.L.F.C. (2008). Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. *Analytica Chimica Acta*, 613, 1-19.
- Masaki, H. (2010). Role of antioxidants in the skin: Anti-aging effects. *Journal of Dermatological Science*, 58, 85-90.
- Matkowski, A. (2008). Plant *in vitro* culture, for the production of antioxidants - A review. *Biotechnology Advance*, 26, 548-560.
- Meenakshi, S., Raghavan, G., Nath, V., Kumar, A.S.R., & Shanta, M. (2006). Antimicrobial, wound healing and antioxidant activity of *Plagiochasma appendiculatum* Lehm. et Lind. *Journal of Ethnopharmacology*, 107, 67-72.
- Montenegro, L., Bonina, F., Rigano, L., Giogilli, S., & Sirigu, S. (1995). Protective effect evaluation of free radical scavengers on UVB induced human cutaneous erythema by skin reflectance spectrophotometry. *International Journal of Cosmetology Science*, 17, 91-103.
- Natarajan, N., Thamaraiselvan, R., Lingaiah H., Srinivasan, P., & Periyasamy, B.M., (2011). Effect of flavonone hesperidin on the apoptosis of human mammary carcinoma cell line MCF-7. *Biomedicine & Preventive Nutrition*, 1, 207-215.
- Neves, J.M., Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G., & Gomes, L.R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Trás-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology*, 124, 270-283.
- Niki, E. (2010). Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. *Free Radicals Biology and Medicine*, 49, 503-515.

- Novais, H.M., Santos, I., Mendes, S., & Pinto-Gomes, C., (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park. *Journal of Ethnopharmacology*, 93, 183-195.
- Parmar, V.S., Jain, R., Sharma, S.K., Vardhan, A., Jha, A., & Taneja, P. (1994). Anti-invasive activity of 3,7-dimethoxyflavone *in vitro*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 83, 1217-1221.
- Pastrana-Bonilla, E., Akoh, C.C., Sallappan, S. & Krewer, G. (2003). Phenolic content and antioxidant capacity of Muscadine grapes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51, 5497-5503.
- Pennington, J.A.T., & Fisher, R.A. (2009). Classification of fruits and vegetables. *Journal of Food Composition and Analysis*, 22, S23-S31.
- Phipps, W.J., Sands, J.K., & Marek, J.F. (2010). *Enfermagem Médico-Cirúrgica*. Loures: Lusodidacta.
- Portugal, M., Barak, V., Ginsburg, I., & Kohen, R. (2007). Interplay among oxidants, antioxidants, and cytokines in skin disorders: present status and future considerations. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 61, 412-422.
- Prior, R.L., Wu, X.L. & Schaich, K. (2005). Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53, 4290-4302.
- Proestos, C., Boziaris, S.I., Nychas, E.G.J. & Komaitis, M. (2006). Analysis of flavonoids and phenolic acids in Greek aromatic plants: Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *Food Chemistry*, 95, 664-671.
- Queiroz, M.B.R., Marcelino, N.B., Ribeiro, M.V., Espindola, L.S., Cunha, F.R., & Silva, M.V. (2009). Development of gel with *Matricaria recutita* L., extract for topic application and evaluation of physical-chemical stability and toxicity. *Latin American Journal of Pharmacology*, 28, 574-579.
- Ramful, D., Aumjaud, B., Neergheen, V.S., Soobrattee, M.A., Googoolye, K. & Aruoma, O.I. (2011). Polyphenolic content and antioxidant activity of *Eugenia pollicina* leaf extract *in vitro* and in model emulsion systems. *Food Research International*, 44, 1190-1196.
- Ratnam, D., Ankola, D., Bhardwaj, V., Sahana, D. & Kumar M. (2006). Role of antioxidants in prophylaxis and therapy: a pharmaceutical perspective. *Journal of Controlled Release*, 113, 189-207.

- Rieger, M.M., & Pains, M. (1993). Oxidative reactions in and on the skin: mechanism and prevention. *Cosmetic & Toiletries*, *108*, 43-56.
- Roger, J.D.P. (2002). A saúde pelas plantas medicinais. Enciclopédia de educação e saúde: Publicadora Atlântico.
- Roginsky, V., & Lissi, E. A., (2005). Review of methods to determine chain breaking antioxidant activity in food. *Food Chemistry*, *92*, 235-254.
- Schmidt, M., & Bastians, H. (2007). Mitotic drug targets and the development of novel anti-mitotic anticancer drugs. *Drug Resistance Updates*, *10*, 162-181.
- Shetty, K. (2004). Role of proline-linked pentose phosphate pathway in biosynthesis of plant phenolics for functional food and environmental applications: a review. *Biochemical Process*, *39*, 789-804.
- Shipley, P.R., Edwards, J.E., Brown, P.N., Talent, N., & Dickinson, T.A. (2012). A review of the chemistry of the genus *Crataegus*. *Phytochemistry*, *79*, 5-26.
- Silva, E.M., Souza, J.N.S., Rogez, H., Rees, J.F., & Larondelle Y. (2007). Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, *101*, 1012-1018.
- Skehan, P., Storeng, R., Scudiero, D., Monks, A., MacMahon, J., & Vistica, D. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *Journal of the National Cancer Institute*, *82*, 1107-1112.
- Spencer, J.P.E., Mohsen, M.M.A.E., & Rice-Evans, C. (2004). Cellular uptake and metabolism of flavonoids and their metabolites: Implications for their bioactivity. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *423*, 148-161.
- Stiborová, M., Bieler, C. A., Wiessler, M., & Frei, E. (2001). The anticancer agent ellipticine on activation by cytochrome P450 forms covalent DNA adducts. *Biochemical Pharmacology*, *62*, 1675-1684.
- Vaz, J.A., Ferreira, I.C.F.R., Tavares, C., Almeida, G.M., Martins, A., & Vasconcelos, M.H. (2012). *Suillus collinitus* methanolic extract increases p53 expression and causes cell cycle arrest and apoptosis in a breast cancer cell line. *Food Chemistry*, *135*, 596-602.
- Vichai, V., & Kirtikara, K. (2006). Sulforhodamine B colorimetric assay for cytotoxicity screening. *Nature Protocols*, *1*, 1112-1116.
- Wojdyło, A., Oszmianski, & Czemerys, R. (2007). Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. *Food Chemistry*, *105*, 940-949

World Health Organization (2010). WHO library cataloguing-in-publication data World Health Statistics 2010. 1. Health status indicators. 2. World health. 3. Health services-statistics. 4. Mortality. 5. Morbidity. 6. Life expectancy. 7. Demography. 8. Statistics. I. World Health Organization. 978 92 4 156398 7 (NLM classification:WA 900.1

Wright J.S., Johnson E.R. & DiLabio G.A. (2001). Predicting the activity of phenolic antioxidants: Theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. *Journal of the American Chemical Society*, *123*, 1173-1183.

# VI. Anexos