



Avaliação da bioatividade e caracterização química de uma espécie medicinal de uso tópico: *Juglans regia* L.

André Antunes dos Santos

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

Orientado por
Isabel Cristina F.R. Ferreira
Ana Maria Pinto Carvalho
Lillian Bouçada de Barros

Bragança
2013

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Professora Doutora Isabel Ferreira, e às minhas co-orientadoras Professora Doutora Ana Carvalho e Doutora Lillian Barros, por toda a ajuda, compreensão, disponibilidade, e prontidão na orientação científica deste trabalho.

À Mestre Ângela Feitor, pela preciosa ajuda na avaliação da atividade antioxidante das amostras em estudo.

Ao Doutor Ricardo Calhelha, por toda a colaboração na avaliação da atividade antitumoral das amostras em estudo.

A toda a equipa do Laboratório de Química e Bioquímica Aplicada (BioChemCore) da Escola Superior Agrária de Bragança, pelo bom ambiente proporcionado ao longo deste trabalho.

Ao Grupo de Investigación en Polifenoles (GIP-USAL) da Faculdade de Farmácia, Universidade de Salamanca, liderado pelo Professor Doutor Celestino Santos-Buelga e à Doutora Montserrat Dueñas, pela colaboração na análise dos compostos fenólicos.

À minha Mãe, por todo o apoio e confiança depositada, bem como toda a educação e percurso profissional que me proporcionou, bem como ao meu Pai, a quem dedico este presente trabalho.

A todos os demais que, de uma forma mais ou menos direta, contribuíram para a realização deste trabalho.

Obrigado!

ÍNDICE GERAL

LISTA DE ABREVIATURAS	v
ÍNDICE DE FIGURAS	vii
ÍNDICE DE TABELAS.....	viii
RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Etnobotânica e Etnofarmacologia.....	1
1.2. Utilização de plantas de uso tópico	3
1.3. Características botânicas da espécie em estudo	4
1.4. Valorização da flora medicinal em estudo	5
1.5. Fitoquímicos com bioatividade	7
1.6. Propriedades antioxidantes e antitumorais de fitoquímicos	12
2. OBJETIVOS	16
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
3.1. Material vegetal e preparação da decocção.....	17
3.2. Reagentes e Padrões.....	17
3.3. Compostos bioativos.....	18
3.3.1. Ácidos orgânicos	18
3.3.2. Mono e oligossacáridos.....	18
3.3.3. Tocoferóis.....	19
3.3.4. Compostos fenólicos	20
3.4. Bioatividade do extrato metanólico e da decocção	21
3.4.1. Avaliação da atividade antioxidante	22
3.4.1.1. Atividade captadora de radicais livres DPPH	22
3.4.1.2. Poder redutor	22
3.4.1.3. Inibição da descoloração do β -caroteno	22
3.4.1.4. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)	23
3.4.2. Avaliação do potencial antitumoral e citotoxicidade	23
3.4.2.1. Atividade antiproliferativa em linhas celulares tumorais humanas	23
3.4.2.2. Hepatotxicidade em células não tumorais	24

3.4.3. Análise estatística	25
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	26
4.1. Identificação e quantificação	26
4.1.1. Ácidos orgânicos	26
4.1.2. Mono e oligossacáridos	27
4.1.3. Tocoferóis	28
4.1.4. Compostos fenólicos	29
4.2. Bioatividade	36
4.2.1. Atividade antioxidante	36
4.2.2. Atividade antitumoral e citotoxicidade	37
5. CONCLUSÕES.....	39
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
7. ANEXOS.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
AHA's	Ácidos alfa-hidroxilo
AVC	Acidente vascular cerebral
BHT	Butil-hidroxitolueno
DMEM	Meio de cultura para células animais (Dulbecco Modified Eagle Médium)
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
dw	Massa seca
EC ₅₀	Concentração de extracto correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor e inibição da peroxidação lipídica
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
e.g.	Por exemplo (Exempli gratia)
EUA	Estados Unidos da América
GAEs	Equivalentes de ácido gálico
GI ₅₀	Concentração da amostra responsável por 50% de inibição do crescimento celular
HBSS	Solução salina de Hank's
HeLa	Linha celular humana de carcinoma cervical
HepG2	Linha celular humana de carcinoma hepatocelular
HIV/SIDA	Vírus da Imunodeficiência Humana/ Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência (High-Performance Liquid Chromatography)
PDA	Detetor de fotodíodos (Photodiode Array Detector)
DAD/ESI-MS	Detetores de díodos/Espetrometria de Massa (Diode Array Detector connected/Mass Spectrometer)
MCF-7	Linha celular humana de adenocarcinoma mamário
Me	Grupo metilo
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente à meticilina (Methicillin resistant <i>Staphylococcus aureus</i>)
MS	Espetrometria de massa
<i>m/z</i>	Razão carga, massa

Nº	Número
NCI-H460	Linha celular humana de carcinoma de pulmão
nd	Não detetado
RI	Índice de refração
RNS	Espécies reativas de azoto (Reactive Nitrogen Species)
ROS	Espécies reativas de oxigénio (Reactive Oxygen Species)
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Meio de cultura para células animais desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial
RSS	Espécies reativas de enxofre (Reactive Sulfur Species)
Rt	Tempo de retenção
SFB	Soro fetal bovino
SD	Desvio padrão
SRB	Sulforodamina B
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
tr	Vestígios
Tris	2-Amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol
UV	Radiação ultravioleta
UV-vis	Radiação ultravioleta visível
v/v	Volume por volume

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Exemplar de <i>J. regia</i> em lameiro, Trás-os-Montes, Portugal, à esquerda. Pormenor de folhagem e floração, à direita. Fonte: Carvalho, 2010	4
Figura 2. Esqueleto C6- C3- C6 comum aos flavonoides.	8
Figura 3. Estrutura química de tocoferóis e tocotrienóis. A substituição de grupos metilo (Me) nas posições R ¹ e R ² determinam se as moléculas são α , β , γ ou δ	11
Figura 4. Antioxidantes vegetais (Adaptado de Carocho e Ferreira, 2013).	14
Figura 5. Perfil individual de ácidos orgânicos em folhas (—) e decocção (—) de <i>J. regia</i> : FM- fase móvel; 1- ácido oxálico; 2- ácido málico; 3- ácido xiquímico; 4- ácido ascórbico; 5- ácido cítrico.	27
Figura 6. Perfil individual de mono e oligossacáridos em folhas (—) e decocção (—) de <i>J. regia</i> : FM- fase móvel; 1- frutose; 2- glucose; 3- sacarose; 4- trealose; 5- melezitose (PI).	28
Figura 7. Perfil individual de tocoferóis em folhas (—) e decocção (—) de <i>J. regia</i> : FM- fase móvel; 1- α -tocoferol; 2- β -tocoferol; 3- γ -tocoferol; 4- δ -tocoferol; 5- Tocol (PI).	29
Figura 8. Perfil individual de compostos fenólicos em folhas de <i>J. regia</i> , obtido a 370 nm (A) e 280 nm.	30

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1. Usos tradicionais de <i>Juglans regia</i> L.	6
Tabela 2. Ácidos orgânicos em folhas e decocção de <i>Juglans regia</i> (média \pm DP).	26
Tabela 3. Mono e oligossacáridos em folhas e decocção de <i>Juglans regia</i> (média \pm DP).	27
Tabela 4. Tocoferóis em folhas e decocção de <i>Juglans regia</i> (média \pm DP).	28
Tabela 5. Tempo de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorção máxima na zona do visível (λ_{\max}), dados do espectro de massa e Identificação provisória de compostos fenólicos em folhas e decocção de <i>Juglans regia</i>	31
Tabela 6. Quantificação de compostos fenólicos no extrato metanólico e decocção de folhas de <i>Juglans regia</i> (mean \pm SD).	35
Tabela 7. Bioatividade do extrato metanólico e decocção de folhas de <i>Juglans regia</i> (média \pm SD).	36
Tabela 8. Avaliação da atividade antitumoral do extrato metanólico e decocção de folhas de <i>Juglans regia</i> (média \pm SD).	38

RESUMO

As folhas de *Juglans regia* L. (nogueira), são consideradas uma fonte de compostos benéficos para a saúde, sendo amplamente utilizadas na medicina tradicional. Alguns dos compostos bioativos presentes e, com maior destaque, são os compostos fenólicos (antioxidantes).

No presente estudo, analisou-se a composição em ácidos orgânicos, mono e oligossacáridos, e tocoferóis nas folhas de noqueira e respetiva decocção (vulgarmente utilizada para aplicações tópicas). A composição fenólica e a bioatividade foram também avaliadas na decocção e no extracto metanólico.

O ácido málico, a sacarose, o α -tocoferol e os ácidos 3-*O*-cafeoilquínicos e quercetina *O*-pentósido foram, respetivamente, o ácido orgânico, dissacárido, isoforma de tocoferol e compostos fenólicos, mais abundantes. O extrato metanólico apresentou maior potencial antioxidante e antitumoral do que a decocção; nenhuma das amostras apresentou toxicidade em culturas de células primárias de fígado.

Este estudo permitiu uma caracterização mais completa de compostos fenólicos de folhas de noqueira e, tanto quanto sabemos, esta é a primeira vez que a presença de procianidinas, derivados de taxifolina e tocoferóis é descrita em folhas de *J. regia*.

ABSTRACT

Juglans regia L. (walnut) leaves are considered a source of healthy compounds, and have been widely used in traditional medicine. Furthermore, they have been reported as a source of bioactive molecules such as the antioxidant phenolic compounds.

In the present study, organic acids, mono and oligosaccharides, and tocopherols were analyzed in leaves and decoction (widely used for topical applications). Furthermore, the phenolic composition and bioactivity of walnut leaves was determined in its decoction and methanol extract.

Malic acid, sucrose, α -tocopherol and 3-*O*-caffeoylquinic acids and quercetin *O*-pentoside were the most abundant organic acid, disaccharide, tocopherol isomer and phenolic compounds, respectively. Methanol extract presented higher antioxidant and antitumor potential than decoction; none of the samples showed toxicity for non-tumor liver primary cells.

This study provides a more complete characterization of phenolic compounds of walnut leaves, and as far as we know, this is the first time that the presence of procyanidins and taxifolin derivatives, as also tocopherols were reported in *J. regia* leaves.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Etnobotânica e Etnofarmacologia

Os conhecimentos relacionados com os usos populares das plantas baseiam-se em milhares de anos de experiência. Na procura constante do seu bem-estar, os seres humanos, por tentativa e erro, aprenderam a reconhecer e usar as plantas que lhe eram úteis, incluindo aquelas que desempenharam uma função mágico-religiosa. Os saberes acerca do uso das plantas eram muito valorizados em civilizações antigas tendo chegado até aos nossos dias. Até meados do século XIX, as plantas foram os principais agentes terapêuticos utilizados por seres humanos, e ainda hoje têm um papel relevante na medicina (Camejo et al., 2003).

O uso do conhecimento tradicional como instrumento promissor em bio-prospecção de plantas úteis para a medicina humana e animal tem tido recentemente um papel importante, contribuindo os métodos de pesquisa etnomédicos e etnobotânicos para a validação de saberes empíricos e o desenvolvimento de novos fármacos à base de plantas (Lans, 2001; Slikkerveer, 2001; Quah e Slikkerveer, 2003; Slikkerveer, 2006).

As dificuldades ou incapacidade de descobrir respostas adequadas e acessíveis para o tratamento de várias doenças, incluindo o cancro, HIV/SIDA, diabetes, hepatite, alergias e distúrbios do foro mental, promoveu a possível integração de medicinas tradicionais e convencionais na pesquisa de novos fitofármacos e produtos naturais para a prevenção e/ou tratamento de doenças, bem como para a promoção da saúde em geral (Slikkerveer, 2006).

A descoberta de extratos com propriedades promissoras e subsequente demonstração da sua atividade tem sido baseada em informações etnofarmacológicas. No campo da atividade anticancerígena, tem-se observado uma correlação entre a atividade biológica de certas espécies e a sua utilização na medicina tradicional. As práticas relacionadas com a medicina tradicional e o uso de plantas medicinais têm sido amplamente documentadas, na maioria dos países em desenvolvimento, e contribuído para satisfazer algumas das necessidades das populações em termos de cuidados de saúde primários (WHO, 2007; Nogueira et al., 2008)

Muitos destes estudos resultam da aplicação de metodologias relacionadas com a Etnobotânica e a Etnofarmacologia, como já referido anteriormente.

Ao longo do tempo, a Etnobotânica e a Etnofarmacologia têm sido vistas de forma diferente de acordo com as correntes científicas e os investigadores (Heinrich, 2006).

Estas disciplinas têm-se desenvolvido e consolidado através do trabalho de equipas multidisciplinares que promovem a interação entre botânicos, antropólogos, linguistas,

médicos, químicos e farmacêuticos. O ponto de partida consiste na inventariação dos conhecimentos tradicionais relativos aos diferentes usos dados às plantas, espontâneas ou cultivadas, pelas diferentes comunidades indígenas e populações de zonas rurais, nas suas atividades quotidianas, estendendo-se a muitos outros setores da população mundial (Cunha, 2005).

O termo etnobotânica originalmente aplicado ao estudo da relação utilitária entre os humanos e o meio vegetal em ambientes primitivos, que inclui o uso para fins medicinais (Harshberger, 1896), evoluiu para um conceito muito mais amplo que cobre não só a relação utilitária, mas também as ligações simbólicas, religiosas, ecológicas e sociais numa interação homem-planta dentro de contextos atuais (Schultes e von Reis, 1995; Alexiades, 1996; Soejarto et al., 2005).

Estes estudos ajudam a caracterizar as populações e comunidades Humanas, recolhendo e documentando os saberes e usos tradicionais relacionados com o uso de plantas medicinais, normalmente transmitidos de geração em geração, para registos escritos com facilidade de consulta futura (Heinrich et al., 2009; Leonti, 2011).

Por outro lado, o termo mais recente Etnofarmacologia, usado pela primeira vez em 1967 no contexto do estudo de plantas com efeitos alucinogénios, sofreu apenas uma ligeira evolução no seu significado desde a definição original: "uma área multidisciplinar de pesquisa, preocupada com a observação, descrição e investigação experimental de fármacos indígenas e respetivas atividades biológicas" (Rivier e Bruhn, 1979). A sua definição contemporânea inclui "o estudo interdisciplinar das ações fisiológicas da planta, animal e outras substâncias usadas em medicamentos do passado e presente pelas comunidades humanas" (International Society of Ethnopharmacology, texto relativo à sua criação em 1997). No centésimo volume do Journal of Ethnopharmacology (ISE, 2005) dedicado às perspectivas da Etnofarmacologia assume-se que o fundamento dos estudos etnofarmacológicos inclui "*o uso de plantas, fungos, animais, microorganismos e minerais e os seus efeitos biológicos e farmacológicos baseados em princípios estabelecidos através de convenção internacional*", bem como "*a observação e investigação experimental das atividades biológicas de substâncias vegetais e animais*", usando abordagens etnofarmacológicas, etnobotânicas, etnoquímicas, farmacológicas e toxicológicas (Soejarto et al., 2005).

Os relatos da experiência e satisfação do uso tradicional de medicamentos à base de plantas, no tratamento de determinadas patologias, contribuem para um interessante processo

de validação múltiplo de plantas medicinais, aromáticas e cosméticas, com o objetivo de proporcionar melhores cuidados de saúde (Slikkerveer, 2006).

1.2. Utilização de plantas de uso tópico

Cosméticos, cosmeceúticos, fitocosméticos e outras preparações à base de plantas de uso tópico não servem só para limpar, modificar ou corrigir odores ou imperfeições da pele, dentes, gengivas, unhas e cabelos (Pieroni et al., 2004). O uso doméstico destas preparações é uma prática comum na medicina tradicional de muitas culturas, também no tratamento de algumas doenças da pele, muitas delas nem sempre totalmente compreendidas pela comunidade médica (Grabner, 1963; Bartoli et al., 1997, Quave e Pieroni, 2001; Pieroni et al., 2004).

Consideram-se vários tipos de afeções da pele como por exemplo, prurido, eritema, edemas, circulação, re-epitelização, cicatrização (Dweck, et al., 2009), doenças bacterianas como furúnculos, carbúnculos, eczemas e foliculite, doenças virais como o sarampo, varíola e verrugas e doenças fúngicas como as micoses e a candidíase (Abbasi et al., 2010).

Muitas das preparações de uso tópico à base de plantas têm efeitos anti-inflamatórios em pequenas feridas e lesões externas, mas também no alívio de inflamações que afetam as articulações, como as frieiras, reumatismo e dores artríticas, músculos e outros tecidos subcutâneos (Guarrera, 2005; Natale e Polio, 2007; Rafael et al., 2011).

A maior parte das aplicações tópicas tradicionais baseiam-se na aplicação direta ou indireta de cataplasmas, banhos e lavagens, vapores e unguentos, aplicação local de infusões e decocções em água ou macerados em água, azeite ou álcool (Camejo et al., 2003; Novais et al., 2004). Muitas outras preparações à base de plantas utilizam excipientes como azeite, banha de porco, cera de abelha, argila, carvão vegetal e cinzas (Pieroni, 2004).

1.3. Características botânicas da espécie em estudo

Família JUGLANDACEAE,

Espécie *J. regia* L.,

Ecologia: cultivado desde a antiguidade em todas as regiões temperadas da Ásia, Europa e Norte de África.

A noqueira é uma árvore de até 25 m (**Figura 1**). Tronco de casca de lisa e cinza. Folhas compostas de 20-35 cm; 5-9 folíolos de 8-15 × 2,5- 6,5 cm, de elípticas a ovadas, subséssis ou pecioladas- pecíolo terminal de 2-5 milímetros; os laterais muito curtos ou inexistentes – inteiros ou às vezes obscuramente serrulados em folhas jovens, de base ± arredondada, oblíqua, muitas vezes assimétrica, e ápice obtuso, agudo ou ligeiramente acuminado; pagina inferior glabra ou com glândulas peltadas. Pecíolo e nervuras sem pêlos glandulíferos. Inflorescência masculina com grande número de flores, densamente dispostas em amentilhos pendentes. Inflorescência feminina 1 - 5 flores. Flores masculinas sésseis, 4 sépalas, 8-40 estames. Flores femininas pilosas, com bractéolas de ápice dentado. Fruto de 4-6 cm, subgloboso, de casca verde, lisa, que depois de seca se torna enegrecida; noz de 3-5 cm de espessura de parede, exceto no caso das variedades comerciais, rugosa, com quatro núcleos na base. Semente cerebriforme (Garmendia e Navarro, 2013).



Figura 1. Exemplar de *J. regia* em lameiro, Trás-os-Montes, Portugal, à esquerda. Pormenor de folhagem e floração, à direita. Fonte: Carvalho, 2010

1.4. Valorização da flora medicinal em estudo

Em Portugal, a noqueira pode ser encontrada em todo o país, sendo a semente, a noz, muito popular e largamente consumida, constituindo um dos ingredientes básicos da dieta das áreas rurais da Península Ibérica. No entanto, os usos não se restringem à alimentação, pelo que não apenas as sementes secas são utilizadas, mas também as nozes verdes, as cascas dos frutos verdes e o próprio endocarpo lenhoso do fruto, o ritidoma do tronco, e as folhas, se empregam como matérias-primas nas indústrias cosmética e farmacêutica (Oliveira et al., 2008a). Em Portugal, como em alguns outros países europeus, especialmente em áreas rurais, as folhas secas de noqueira são frequentemente usadas para infusões e decocções (Amaral et al., 2004; Pereira et al., 2007) e outros preparados feitos a partir de outras partes da planta (Tabela 1) para o tratamento de inflamações da pele e úlceras, como antidiarreico, anti-helmíntico, com propriedades anti-sépticas e adstringentes e ainda como corante de madeiras e de cabelo (Bruneton, 2001; Cunha et al., 2006, Almeida et al., 2008; Carvalho, 2010).

Nos últimos anos, vários estudos têm demonstrado diversas atividades obtidas através de extratos desta planta: atividades anticancerígenas e antiproliferativas *in vitro*, em linhas celulares cancerígenas de rim e cólon humanos (Carvalho et al., 2010), atividade antioxidante e neutralizadora de ROS (espécies reativas de oxigénio) e RNS (espécies reativas de azoto) (Almeida et al., 2008), atividade antinocicetiva e anti-inflamatória *in vivo* em ratos (Erdemoglu et al., 2003), redução da adesão e formação de biofilme por *Staphylococcus aureus* metilino-resistentes (MRSA) (Pereira et al., 2007), atividade antimicrobiana em bactérias Gram positivo e Gram negativo, e fungos (Pereira et al., 2008; Agulló et al., 2013).

Estes resultados indicam que a noqueira constitui uma excelente fonte de antioxidantes naturais e agentes quimiopreventivos, justificando o uso terapêutico da noqueira em doenças inflamatórias (Almeida et al., 2008; Carvalho et al., 2010).

As folhas de noqueira são ricas em compostos fenólicos, incluindo flavonoides, provavelmente responsáveis pela atividade antibacteriana dos extratos desta planta (Stampar et al., 2006; Pereira et al., 2008). Entre os diversos compostos fenólicos já identificados encontram-se: ácido 3cafeoilquínico, ácido 3-*p*-cumaroilquínico e ácido 4-*p*-cumaroilquínico, quercetina 3-galactósido, quercetina 3-arabinósido, quercetina 3-xilósido, quercetina 3-ramnósido e dois compostos parcialmente identificados (derivados de quercetina 3- pentósido e campferol 3-pentósido). São referidos outros ácidos fenólicos como o ácido cafeico, ferúlico, *p*-cumárico, *p*-hidroxifenilacético, gálico, salicílico, e campferol 3-arabinósido (Wichtl e Anton, 1999; Amaral et al., 2004).

Recentemente foram identificados e quantificados mais de 70 constituintes de óleo essencial de folha de noqueira, com rendimentos entre 0,02 e 0,12% em folhas frescas (Verma et al., 2013).

Tabela 1. Usos tradicionais de *Juglans regia* L.

Parte utilizada	Indicação e propriedades terapêuticas	Via e forma de administração	Referencias
Raízes	Diurético, laxante	Oral. Macerado	Neves et al., 2009
Rebentos	Feridas	Uso tópico. Decocção	Akerreta et al., 2010
Folhas	Diabetes e mal de rins	Oral, infusão	Carvalho, 2010
	Desinfetante e anti-inflamatório. Sistema digestivo, geniturinário, pós-parto, feridas e furúnculos, queimaduras, inflamações da boca e dentes, alopecia, calvície, dermatite, hemorróidas, vulnerário, diarreias ligeiras, insuficiência venosa, inflamações superficiais, antipruriginoso, antipodálgico, diaforese excessiva, dispepsias hipossecretoras, febre, fortificante muscular e ósseo	Oral e uso tópico. Infusão e decocção	Carvalho, 2010, Guarrera, 2005, Akerreta et al., 2010, Benitez et al., 2010, Blanco et al., 1999, Bruneton, 2001, Cunha, 2005, Neves et al., 2009
	Hipoglicemiante, dores abdominais	Oral. Infusão	Novais et al., 2004
	Antisséptico, antirreumático, antipodálgico, queimaduras	Uso tópico. Maceração em álcool ou azeite	Guarrera, 2005, Novais et al., 2004
	Furúnculos	Uso tópico. Cataplasma com banha de porco	González et al., 2010
	Obesidade, prostatismo, úlceras, contra cálculos renais.	Oral. Decocção	Benitez et al., 2010, Blanco et al., 1999
	Faringites, anti-séptico e anti-inflamatório dental	Bochecho. Decocção	Blanco et al., 1999
Verrugas, acne	Unguento com azeite	Guarrera 2005	
Flores	Odontalgia	Oral e bochecho. Decocção	Benitez et al., 2010, Carvalho, 2010
Frutos	Hipocolesterolemiantes, Diabetes	Ingestão	Benitez et al., 2010
	Antiespasmódico	Oral. Maceração em aguardente	González et al., 2010
Exocarpo	Tónico, vermífugo, corante capilar	-	Neves et al., 2009, Cunha, 2005, Carvalho, 2010
Casca	Emético	Oral	Neves et al., 2009

1.5. Fitoquímicos com bioatividade

Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos incluem diferentes subclasses como flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, taninos, linhanos e polifenóis oxidativos, apresentando uma grande diversidade de estruturas químicas, algumas das quais nem sempre elucidadas e detetadas pelos métodos analíticos habituais (George et al., 2005; Ferreira et al., 2009).

São compostos aromáticos hidroxilados, que possuem um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxilo. Acumulam-se como produtos finais a partir das vias do chiquimato e acetato, podendo variar entre moléculas relativamente simples (ácidos fenólicos, flavonoides, fenilpropanoides) e compostos altamente polimerizados (lenhinas, melaninas, taninos) (Bravo, 1998; Ferreira et al., 2009).

Os ácidos fenólicos podem ser divididos em dois grupos principais, ácidos hidroxibenzoicos derivados do ácidobenzoico, e ácidos hidroxicinâmicos derivados do ácido cinâmico. Os derivados do ácido hidroxibenzoico ocorrem geralmente na forma ligada, formando componentes de estruturas complexas como lenhinas e taninos hidrolisáveis, podendo ser encontrados também ligados a açúcares ou ácidos orgânicos em plantas.

Os derivados do ácido hidroxicinâmico ocorrem principalmente na forma ligada à parede celular de componentes estruturais como a celulose, a lenhina e proteínas, bem como associados a ácidos orgânicos, como o ácido tartárico ou quínico, através de ligações de éster (Liu, 2004; Ferreira et al., 2009).

Vários estudos mostram que os compostos fenólicos são fitoquímicos bioativos com benefícios para a saúde humana (Cao et al., 1996; Sun et al., 2002; Silva et al., 2004, 2008; Giada e Filho, 2006; Parry et al., 2006; Yang et al., 2009; Carvalho et al., 2010).

Os compostos fenólicos têm sido descritos como tendo múltiplos efeitos biológicos, incluindo propriedades antioxidantes, antitumorais, antimutagénicas e antibacterianas (Shui e Leong, 2002).

Alguns compostos fenólicos possuem a capacidade de eliminar os produtos de peroxidação lipídica, prevenir lesões oxidativas do DNA e bloquear ROS, tais como superóxido, peróxido de hidrogénio e radicais hidroxilo (Kahkonen et al., 1999; Guimarães et al., 2013).

Os flavonoides representam um grande grupo de compostos fenólicos com ação antioxidante, que ocorrem naturalmente nas plantas e são encontrados em frutos, legumes, grãos, cascas, raízes, caules, flores e produtos derivados como o chá e vinho (Liu, 2004).

São caracterizados pelo esqueleto C₆- C₃- C₆ e possuem como estrutura básica dois anéis aromáticos (A e B) ligados a três cadeias de carbono, geralmente um anel heterocíclico oxigenado ou um anel C (**Figura 2**) (Iwashina, 2000; Ferreira et al., 2009).

As várias classes de flavonoides são diferenciadas com base na estrutura genérica do anel heterocíclico e no anel C, sendo classificados em flavonois, flavonas, flavanonas, flavanóis, antocianinas e isoflavonoides (Nijveldt, 2001; Ferreira et al., 2009).

São frequentemente encontrados na natureza conjugados em formas glicosiladas ou esterificados, ou como agliconas em alimentos processados (Hollman, 2000; Ferreira et al., 2009).

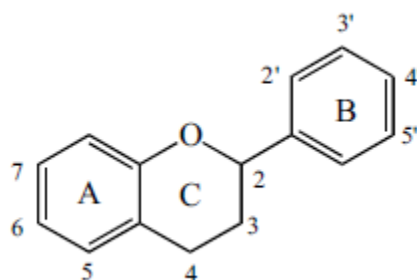


Figura 2. Esqueleto C₆- C₃- C₆ comum aos flavonoides.

Os flavonoides são os compostos fenólicos mais abundantes nas plantas (Mladenka et al., 2010; Guimarães et al., 2013) e os seus efeitos sobre a saúde humana são muitas vezes atribuídos à sua capacidade de neutralizar radicais livres em sistemas biológicos, fornecendo assim uma proteção antioxidante (Galleano et al., 2010, Guimarães et al., 2013). Efetivamente, os polifenóis possuem uma estrutura química que suporta a captação de radicais livres e a quelatação de metais redox. Tem sido descrito que os flavonoides podem proporcionar benefícios em situações patológicas associadas à elevada produção de radicais livres (Galleano et al., 2010; Guimarães et al., 2013).

Os flavonoides têm sido relacionados com diferentes processos de promoção da saúde, pelas suas propriedades antioxidantes, anti-alérgicas, anticancerígenas, antiespasmódicas, antivirais, antibacterianas, anti-inflamatórias e anti-estrogénica e hepatoprotetoras (Middleton et al., 2000; Havsteen, 2002; Zhang et al., 2005).

Têm demonstrado ser eficientes na neutralização de várias moléculas oxidantes, incluindo o oxigénio singlete e vários radicais livres que podem estar envolvidos em danos no DNA e na indução de tumores (Wright et al., 2001). Alguns deles demonstraram ainda propriedades fotoprotetoras quando aplicados topicamente na pele nomeadamente, a silimarina, isoflavonas de soja e os polifenóis do chá (Pinnell, 2003).

Alguns flavonoides apresentam atividades anticancerígenas e inibidoras do crescimento de células tumorais *in vitro*: podem interagir com enzimas do metabolismo xenobiótico, possuir efeitos anti-iniciadores e/ou antipromotores, ou mesmo, ser citostáticos (Bruneton, 2001). Flavonoides como a naringina, nobiletina e hesperitina já demonstraram um efeito anticancerígeno por paragem do ciclo celular e indução de apoptose em linhas celulares humanas (Kim et al, 2008; Luo et al., 2008; Park et al., 2012).

A principal atividade farmacológica atribuída aos flavonoides é a sua propriedade venotónica, capaz de diminuir a permeabilidade capilar e aumentar a sua resistência. O cirsiol e a hipolaetina, são flavonoides com grande capacidade de inibir a produção de leucotrienos mediadores da inflamação e das manifestações alérgicas. Outros flavonoides como o luteolina, apigenina e a crisina, têm a capacidade de inibir a ciclooxigenase e a agregação plaquetária. As propriedades destes compostos foram maioritariamente estudadas em condições *in vitro*. A biodisponibilidade destas moléculas no ser humano é, regra geral pequena e as atividades descritas *in vitro* raramente estão relacionadas a efeitos *in vivo*. Alguns dos efeitos biológicos devem-se a heterósidos que se hidrolisam no trato digestivo. Apesar dos numerosos trabalhos publicados sobre as potencialidades farmacológicas destas moléculas, não se podem estabelecer regras claras sobre a relação estrutura/atividade (Bruneton, 2001).

O aumento do consumo destes compostos na forma de suplementos dietéticos tem estimulado o estudo dos efeitos tóxicos pela ingestão excessiva destes compostos. Em doses mais elevadas, os flavonoides podem atuar como agentes mutagénicos, pro-oxidantes geradores de radicais livres e como inibidores de enzimas envolvidas no metabolismo hormonal, podendo estes efeitos adversos superar os seus efeitos benéficos (Skibola e Smith, 2000; Caroch e Ferreira, 2013).

Ácidos orgânicos

As plantas possuem uma diversidade única de metabolitos, incluindo ácidos orgânicos. Estes compostos apresentam uma variedade de funções quer no metabolismo primário, quer no secundário (Bennet-Clark, 1993). Na verdade, os ácidos orgânicos estão envolvidos em várias vias anabólicas e catabólicas das plantas como produtos intermediários ou finais (Pereira et al., 2012).

Os ácidos orgânicos, presentes em frutos e vegetais, podem encontrar-se na forma livre ou esterificados nomeadamente com açúcares (Gundogdu e Yilmaz, 2012).

Os ácidos cítrico, málico, succínico, fumárico e oxálico desempenham um papel fundamental no ciclo de Krebs, que é a via central de produção de energia da célula, estando envolvidos no metabolismo de glúcidos, lípidos e proteínas (Bennet-Clark 1993). O ácido málico está envolvido na respiração e fotossíntese; juntamente com os ácidos cítrico e oxálico participa no transporte de catiões e em processos que ocorrem na rizosfera, incluindo a aquisição de nutrientes, a destoxificação de metais, a redução do stresse anaeróbio em raízes, absorção de minerais e atração microbiana (Mucha, 2005).

Os ácidos málico, cítrico, tartárico, succínico, e hidroxiglutarico também se comportam como antioxidantes, porque eles têm a capacidade de quelar metais. O ácido oxálico é o ácido dicarboxílico mais simples e possui uma forte capacidade quelante de catiões polivalentes (Oliveira et al., 2008b).

O conteúdo em ácidos orgânicos nos alimentos influencia, não só, as suas propriedades organolépticas, como também a estabilidade microbiana, valor nutricional e aceitabilidade por parte do consumidor (Vaughan e Geissler 1997; Poyrazoglu et al., 2002). Podem também ser úteis em processos de autenticidade e avaliação da qualidade de matrizes alimentares (Gebre et al., 1994; Pereira et al., 2012).

São também amplamente utilizados como aditivos alimentares no fabrico de bebidas à base de fruta e legumes. Os principais ácidos utilizados em bebidas são os ácidos cítrico, málico e tartárico como acidulantes, e o ácido ascórbico como antioxidante (Pereira et al., 2012; Scherer et al., 2012).

Alguns ácidos orgânicos, denominados de ácidos alfa-hidroxi (AHA's) são utilizados em produtos dermatológicos e cosméticos, incrementando funções como a esfoliação e hidratação da pele. Os AHA's mais utilizados em aplicações cosméticas são tipicamente derivados de produtos alimentares, incluindo ácido glicólico (a partir de cana-de-açúcar), ácido láctico (a partir do leite), ácido málico (a partir de maçãs), ácido cítrico (a partir de citrinos) e ácido tartárico (a partir de vinho) (Kneedler et al., 1998; Lamberg, 1998; Silva et al., 2004).

Sacáridos

Os hidratos de carbono são uma família diversa e complexa de compostos incluindo os mono, oligo e polissacáridos (Molnár-Perl, 2000; Muir et al., 2009). Os monossacáridos são as unidades básicas mais importantes, que incluem principalmente hexoses redutoras (glucose, glucosamina, galactose, manose, etc.) e pentoses (ribose, arabinose, etc.). A lactose

e a maltose são dissacáridos que fazem parte dos açúcares redutores, também responsáveis pela atividade antioxidante (Paulus e Klockow, 1996; Guimarães et al., 2009). As propriedades antioxidantes dos polissacáridos são geralmente influenciadas pelas suas características químicas, tais como a massa molecular, grau de ramificação, tipos de monossacáridos, associações intermoleculares de polissacáridos, ramificação glucosídica, e modificação de polissacáridos (Liu et al., 1997).

Muitos polissacáridos têm a capacidade de fixar água muito lentamente, com a tendência de trocar essas moléculas de água por substâncias polifenólicas sendo utilizados em cosmética pelo seu efeito protector e hidratante (Cunha et al., 2008).

Tocoferóis

A vitamina E é composta por oito isoformas, com quatro tocoferóis (α , β , γ e δ) e quatro tocotrienóis (α , β , γ , δ), que divergem na saturação da cadeia lateral (Bruneton, 2001). Estruturalmente, apresentam uma cadeia hidrofóbica isoprénica, normalmente inserida nas membranas celulares, e uma parte polar, cromanol, exposta à superfície da membrana. É nos substituintes do cromanol (grupos metilo em diferentes posições) que se distinguem os vários isómeros (α , β , γ e δ), embora contenham todos um grupo hidroxilo que lhes confere propriedades antioxidantes (Azzi, 2000; Pinnell, 2003) (Figura 3).

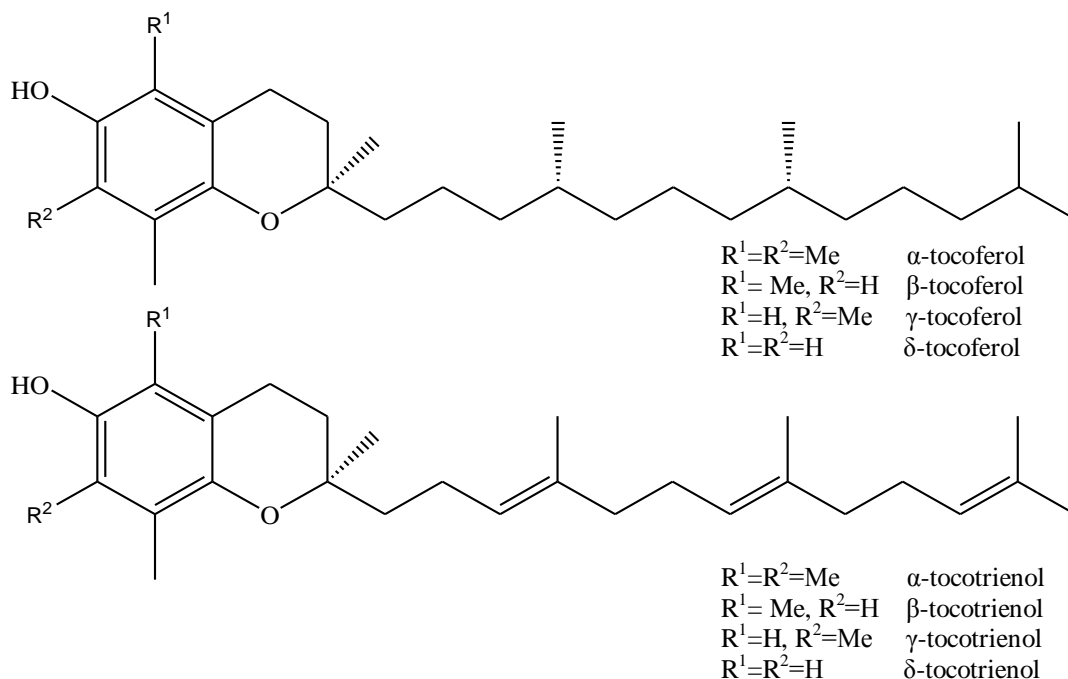


Figura 3. Estrutura química de tocoferóis e tocotrienóis. A substituição de grupos metilo (Me) nas posições R^1 e R^2 determinam se as moléculas são α , β , γ ou δ .

A vitamina E é o maior antioxidante lipossolúvel encontrado no plasma, glóbulos vermelhos, extrato córneo e tecidos, o que permite proteger a integridade das estruturas lipídicas, principalmente as membranas (Burton e Traber, 1990; Pinnell, 2003; Caroch e Ferreira, 2013). É um componente dietético essencial para os mamíferos e sintetizada exclusivamente por organismos fotossintéticos (Caretto et al., 2009). A vitamina E e, em particular os tocoferóis, são antioxidantes autorizados na indústria alimentar na forma natural ou sintética (E306 a E309) (Bruneton, 2001).

A vitamina E interrompe a peroxidação lipídica, pela doação do hidrogénio fenólico para os radicais peróxido, formando radicais tocoferoxilo que, não sendo reativos, não continuam as reações de oxidação em cadeia (Burton e Traber, 1990; Caroch e Ferreira, 2013). O ácido ascórbico, vulgarmente designado de vitamina C, tem a capacidade de regenerar a vitamina E a partir do radical tocoferoxilo, para uma forma intermédia, restabelecendo assim o seu potencial antioxidante. Desta forma, verifica-se um efeito sinérgico entre estas duas vitaminas (Halpner et al., 1998; Bruneton, 2001; Caroch e Ferreira, 2013).

Devido ao seu papel captador de radicais livres, parece proteger o nosso organismo de várias disfunções degenerativas, nomeadamente cancro e doenças cardiovasculares (Fang et al., 2002). Em particular, a vitamina E parece exercer um efeito protetor em fases precoces da indução da carcinogénese (trato digestivo, pulmão) (Bruneton, 2001).

Biossinteticamente, os tocoferóis derivam do ácido homogentísico (Bruneton, 2001); o α -tocoferol era considerada a forma de vitamina E biologicamente mais activa, no entanto, recentemente têm-se destacado os efeitos benéficos para a saúde de outras isoformas de vitamina E, nomeadamente γ -tocoferol (Ferreira, 2011).

1.6. Propriedades antioxidantes e antitumorais de fitoquímicos

Os radicais livres são átomos, moléculas ou iões com eletrões desemparelhados altamente instáveis e ativos para reações químicas com outras moléculas (Lü et al., 2010; Caroch e Ferreira, 2013).

O equilíbrio entre a produção e a neutralização de ROS por antioxidantes é muito suscetível, e se esse equilíbrio tender para a superprodução de ROS, as células começam a sofrer as consequências do stresse oxidativo (Wiernsperger, 2003; Caroch e Ferreira, 2013).

Endogenamente, os radicais livres são produzidos como uma parte normal do metabolismo da mitocôndria, através da xantina-oxidase, peroxissomas, processos

inflamatórios, fagocitose, via do araquidonato, isquemia e exercícios físicos. Os fatores externos que ajudam a promover a produção de radicais livres são o tabagismo, poluentes ambientais, radiação, drogas, pesticidas, solventes industriais e o ozono. Alguns dos elementos essenciais para a vida, nomeadamente o oxigénio, têm efeitos prejudiciais sobre o corpo humano através destas espécies reativas (Lobo et al., 2010; Carochó e Ferreira, 2013).

Os radicais livres têm diferentes tipos de mecanismos de reação, podendo reagir com moléculas vizinhas por: doação de eletrões, redução de radicais, aceitação de eletrões, oxidação de radicais, abstração de hidrogénio, reações de adição, reações de auto-aniquilação e por dismutação (Slater, 1984; Carochó e Ferreira, 2013).

Estas reações levam à produção de ROS, RNS e RSS (espécies reativas de enxofre), que têm sido associadas a várias doenças graves como o cancro, doenças cardiovasculares incluindo a aterosclerose e AVC's, distúrbios renais e hepáticos, hipertensão, artrite reumatoide, síndrome de deficiência respiratória em adultos, doenças de deficiência auto-imune, inflamação, doenças degenerativas associadas à idade, diabetes *mellitus*, cataratas, obesidade, autismo, Alzheimer, Parkinson e doenças de Huntington, vasculite, glomerulonefrite, lúpus eritematoso, úlceras gástricas, hemocromatose e pré-eclâmpsia, entre outras (Rahman, 2007; Lobo et al., 2010; Lü et al., 2010; Singh et al., 2010; Carochó e Ferreira, 2013).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado de forma consistente que há uma associação clara e positiva entre o consumo de frutos e verduras e uma redução da incidência de doenças isquémicas do coração e certos tipos de cancro, especialmente do estômago, esófago, pulmão, cavidade orofaríngea, endométrio, pâncreas e colon (Block et al., 1992; Heimendinger et al., 1996; Reddy et al., 2003; Mathew et al., 2004; Jenab et al., 2004; Carvalho et al., 2010).

Estas propriedades antioxidantes e quimiopreventivas têm sido atribuídas ao seu elevado teor de antioxidantes naturais, especialmente ácido ascórbico (vitamina C), tocoferóis (vitamina E), β -caroteno (provitamina A), antocianinas e outros polifenóis (**Figura 4**) (Cao et al., 1996; Silva et al., 2004, 2008; Giada e Filho, 2006; Carvalho et al., 2010).

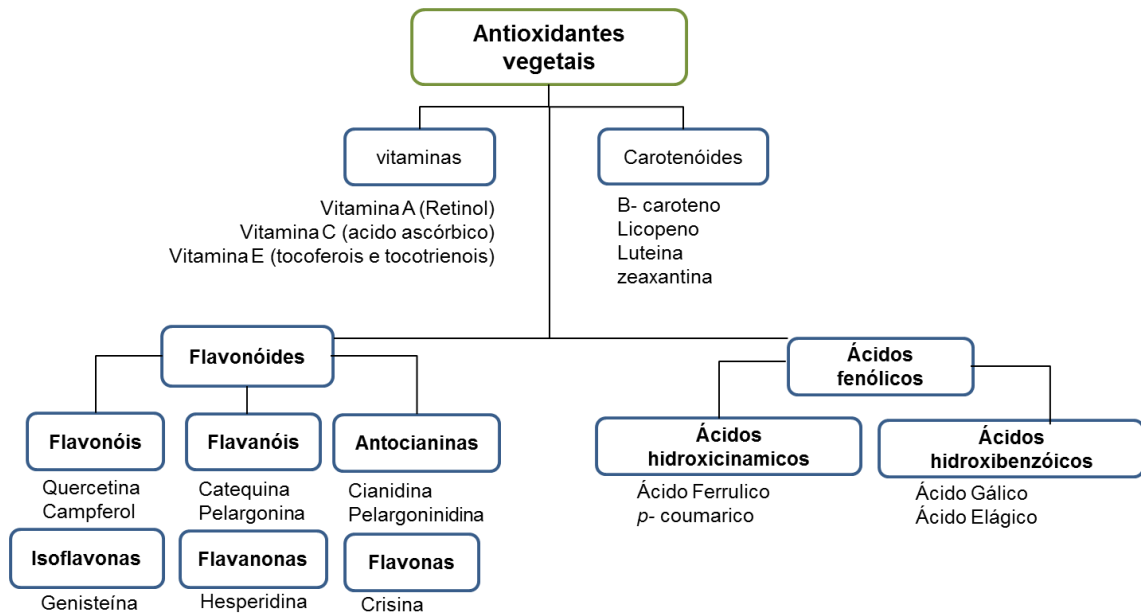


Figura 4. Antioxidantes vegetais (Adaptado de Carochó e Ferreira, 2013).

A vitamina A ou retinol é um caroteno produzido no fígado, resultante da decomposição do β - caroteno, conhecido pelos seus efeitos benéficos sobre a pele, olhos e órgãos internos. A sua capacidade antioxidante é conferida pela sua capacidade de combinação com radicais peróxido antes da sua propagação peroxidativa de lípidos (Palace et al., 1999; Jee et al., 2006; Carochó e Ferreira, 2013).

A vitamina C ou ácido ascórbico, hidrossolúvel (Pinnell, 2003), inclui dois compostos com atividade antioxidante: o ácido L-ascórbico e ácido L- desidroascórbico, ambos absorvidos no trato gastrointestinal. O ácido L-ascórbico é essencial na biossíntese de colagénio e pode inibir a biossíntese de elastina (Pinnell, 2003). O ácido ascórbico é eficaz na neutralização do radical anião superóxido, peróxido de hidrogénio, radical hidroxilo, oxigénio singlete e óxido nítrico (Barros et al., 2011a), considerado também um pró-oxidante (Duarte e Lunec, 2005; Carochó e Ferreira, 2013).

Os carotenoides são um grupo de pigmentos naturais sintetizados por plantas e microrganismos, e podem ser separados em dois grupos: carotenoides hidrocarbonetos, conhecidos como carotenos, que contêm grupos terminais específicos (e.g. licopeno e β - caroteno) e os carotenoides oxigenados conhecidos como xantófilas (e.g. luteína e zeaxantina). As suas propriedades antioxidantes devem-se à capacidade de neutralização do oxigénio singlete. Este facto ocorre principalmente porque os carotenoides possuem ligações duplas conjugadas. Só os radicais peróxido conseguem destruir completamente estes pigmentos. Os carotenoides são relativamente não reativos, mas podem decompor e formar

compostos não radicalares que podem terminar as reações em cadeia dos radicais livres (Paiva e Russell, 1999; Carochó e Ferreira, 2013).

A importância de compostos antioxidantes de matérias vegetais na manutenção da saúde e proteção contra doenças tem aumentado o interesse entre a comunidade científica, em produtores de alimentos e consumidores, que têm demonstrado preferência para alimentos funcionais (Kahkonen et al., 1999).

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos:

- i) Caracterizar quimicamente folhas de *Juglans regia* L. (Juglandaceae), bem como as decocções obtidas, recorrendo a análise cromatográfica de ácido ascórbico e outros ácidos orgânicos, açúcares, tocoferóis e compostos fenólicos.
- ii) Determinar a bioatividade das mesmas preparações através da avaliação da atividade antioxidante (efeitos captadores de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica em homogeneizados cerebrais), atividade antitumoral (em linhas celulares humanas tumorais) e toxicidade em células não tumorais (culturas primárias de células de fígado de porco).
- iii) Contribuir para a valorização da flora medicinal silvestre e validação das práticas tradicionais.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material vegetal e preparação da decocção

Juglans regia L. (Fagales, Juglandaceae), uma espécie arbórea naturalizada e amplamente difundida na Europa, possui folhas compostas, pinadas de 25-40 cm de comprimento, com 5-9 pares de folíolos, emparelhados alternadamente ao longo do pecíolo, com um folíolo terminal. No início do verão, recolheram-se as folhas completamente expandidas a partir da copa externa de dez árvores dispersas, cultivadas em regime extensivo em zonas florestais do Nordeste Transmontano, região de Trás-os-Montes. De acordo com informação obtida junto dos proprietários as árvores pertencem todas à mesma variedade, variedade essa muito antiga e outrora frequente em toda a área de estudo. A metodologia de colheita do material vegetal para análise seguiu de perto o conhecimento tradicional e as práticas usadas na medicina popular, registados anteriormente em levantamentos etnobotânicos realizados na região (Carvalho, 2010). Todo o material colhido foi misturado de modo a obter uma amostra homogênea e representativa dos exemplares selecionados. Foi posteriormente, liofilizado (liofilizador FreeZone 4.5, Labconco).

Para a preparação da decocção, a amostra liofilizada (1 g) foi adicionada a água destilada (200 mL) e aquecida (placa de aquecimento, VELP scientific) até à ebulição durante 5 min. Deixou-se arrefecer à temperatura ambiente e filtrou-se em papel Whatman nº 4. Posteriormente, congelou-se e liofilizou-se.

3.2. Reagentes e Padrões

Os solventes acetonitrilo 99.9%, n-hexano 95% e acetato de etilo 99.8% eram de gradiente HPLC da Fisher Scientific (Lisboa, Portugal). O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) foi adquirido à Sigma (St. Louis, MO, EUA), bem como o ácido L-ascórbico e os padrões de tocoferóis, açúcares e ácidos orgânicos.

Os padrões de compostos fenólicos foram obtidos na Extrasynthese (Genay, França). O tocol racémico, 50 mg/mL, foi adquirido à Matreya (PA, EUA), enquanto o 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA).

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

O ácido acético, a elipticina, a sulforodamina B (SRB), o azul tripano, o ácido tricloroacético (TCA) e o Tris (2-amino-2-(hidroximetil)propano-1,3-diol) foram também adquiridos à Sigma (St. Louis, MO, EUA).

A água destilada foi tratada num sistema de purificação de água Milli-Q (TGI Pure water systems, EUA).

3.3. Compostos bioativos

3.3.1. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados na decocção e nas folhas (material seco). Neste último caso, procedeu-se a uma extração da amostra (1,5 g) com ácido metafosfórico (25 mL, 25 °C, 150 rpm, 4,5%) e filtrou-se em papel Whatman nº 4. Antes da análise por cromatografia líquida ultra rápida (UFLC) acoplada a um detetor de Fotodíodos (PDA-Photodiode array detector), a amostra foi novamente filtrada em filtros de nylon de 0,2 µm. Este procedimento foi otimizado e validado pelo grupo de investigação onde se inseriu este trabalho (Pereira et al., 2013). A análise foi realizada num UFLC Shimadzu serie 20A (Shimadzu Cooperation). A separação foi conseguida numa coluna C18 Sphereclone (Phenomenex) de fase reversa (5µm, 250x4,6 mm i.d.), termostaticada a 35 °C. A eluição foi feita com ácido sulfúrico (3,6 mM) com uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min. A deteção foi levada a cabo pelo PDA, usando 215 e 245 nm (para o ácido ascórbico) como comprimentos de onda preferenciais. Os ácidos orgânicos foram quantificados por comparação da área dos seus picos registados, com as curvas de calibração obtidas pelos padrões comerciais de cada composto: ácido ascórbico ($y=8E+07x+55079$; $R^2=1$); ácido cítrico ($y=1E+06x+4170.6$; $R^2=1$); ácido málico ($y=952269x+17803$; $R^2=1$); ácido oxálico ($y=1E+07x+96178$; $R^2=0,999$); ácido xiquímico ($y=9E+07x-95244$; $R^2=0,999$). Os resultados foram expressos em g por 100 g de folhas ou decocção (material seco, dw).

3.3.2. Mono e oligossacáridos

Os mono e oligossacáridos foram determinados na decocção e nas folhas (material seco). Neste último caso, à amostra liofilizada (1 g) foi adicionado 1 mL de padrão interno-melezitose (PI, 25 mg/mL), seguindo-se a extração com etanol 80% (40 mL) em banho a 80 °C durante 1h30 min, com agitação a cada 15 min. Após filtração para um balão, levou-se a evaporar para remoção do etanol (evaporador rotativo Büchni-210). Posteriormente, lavou-se

a fase aquosa 3 vezes sucessivas com éter etílico (10 mL). Perfez-se a solução do extrato até um volume de 5 mL com água destilada, filtrou-se para um vial e analisou-se por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC). Este procedimento foi otimizado e validado pelo grupo de investigação onde se inseriu este trabalho (Barros et al., 2011b). O equipamento consiste num sistema integrado com uma bomba (Knauer, Smartline system 1000, Berlim, Alemanha), um sistema desgaseificador (Smartline manager 5000), um amostrador automático (AS-2057 Jasco, Easton, MD) e equipado com um detetor de índice de refração (RI) (Knauer Smartline 2300). Os dados foram analisados pelo software Clarity 2.4 (DataApex). A separação foi levada a cabo pela coluna 100-5 NH2 Eurospher (4,6x250 nm, 5 mm, Knauer), funcionando a 30 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel foi acetonitrilo:água destilada (70:30 v/v) com um caudal de 1 mL/min. A identificação foi efetuada por comparação com os padrões e a quantificação através do método padrão interno (melezitose), cujos teores foram expressos em g por 100 g de folhas ou decocção (material seco, dw).

3.3.3. Tocoferóis

Os tocoferóis foram determinados na decocção e nas folhas (material seco). Neste último caso, adicionou-se à amostra (500 mg) uma solução de Butil-hidroxitolueno (BHT, antioxidante) em hexano (10 mg/mL, 0,10 mL) e uma solução de tocol (padrão interno) em hexano (50 µg/mL, 0,4 mL). A amostra foi homogeneizada com metanol (4 mL) no vórtex (1 min). De seguida, adicionou-se hexano (4 mL) homogeneizando-se novamente no vórtex (1 min). Posteriormente, adicionou-se uma solução aquosa concentrada de cloreto de sódio (2 mL), seguida de homogeneização (1 min) e centrifugação (5 min, 4000 g, 10 °C). O sobrenadante foi transferido para um vial previamente envolvido em papel de prata. A amostra foi re-extraída mais 2 vezes com hexano. Ao extrato final foi adicionado sulfato de sódio anidro, seco sob corrente de azoto e, posteriormente, redissolvido em hexano (2 ml), filtrado com um filtro descartável LC de 0,22 µm e transferido para um vial âmbar. Este procedimento foi otimizado e validado pelo grupo de investigação onde se inseriu este trabalho (Barros et al., 2010). A análise foi efectuada no HPLC acima referido, ligado a um detetor de fluorescência (FP-2020; Jasco), programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. A separação foi levada a cabo pela coluna de fase normal de Poliamida II (250 mmx4.6 mm i.d., YMC Waters) funcionando a 30 °C. A fase móvel foi uma mistura de n-hexano/ acetato de etilo (70:30, v/v) com um caudal de 1 mL/min e um volume de injeção de 20 µL. A identificação foi efectuada por comparação com os padrões e a quantificação através

do método padrão interno (tocol), cujos resultados foram expressos em mg por 100 g de folhas ou decocção (material seco, dw).

3.3.4. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos foram determinados na decocção e nas folhas (material seco). Neste último caso, a amostra liofilizada (1,5 g) foi extraída com 30 mL de metanol a 150 rpm durante 1h. O extrato foi filtrado e o resíduo re-extraído mais 2 vezes. Os extratos combinados foram evaporados a 35 °C até remoção completa do metanol e filtrados em discos descartáveis LC de 0,22 µm. Este procedimento foi otimizado e validado pelo grupo de investigação de Polifenóis da Universidade de Salamanca que colaborou neste trabalho (Guimarães et al., 2013). A análise foi efetuada por HPLC (Hewlett-Packard 1100, Agilent Technologies, Santa Clara, EUA), com uma bomba quaternária, com dupla detecção online levada a cabo por um detetor de díodos (DAD) usando os comprimentos de onda de 280 nm e 370 nm preferenciais e um espectrómetro de massa (MS) (API 3200 Qtrap, Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha) ligado ao sistema de HPLC. Utilizou-se uma coluna Waters Spherisorb S3 ODS-2 C8, 3 µm (4,6x150 mm) termostaticada a 35 °C. A fase móvel foi (A) ácido fórmico/água (0,1%) e (B) acetonitrilo. O gradiente de eluição estabelecido foi isocrático 15% B até 5 min, 15-20% B até 5 min, 20-25% B mais 10 min, 25-35% B mais 10 min, 35-50% B mais 10 min e reequilíbrio da coluna; usou-se uma taxa de fluxo de 0.5 mL/min. A detecção MS foi realizada num API 3200 Qtrap (Applied Biosystems, Darmstadt, Alemanha) equipado com uma fonte de ionização Electrospray (ESI) num analisador de massa de armadilha de ião-quadrupolo tripla, controlada pelo software Analyst 5.1. Usou-se ar de grau zero (30 psi) como gás de nebulização e gás turbo para secagem do solvente (400 °C, 40 psi). O azoto serviu como cortina (20 psi) e gás de colisão (médio). A tensão de spray dos iões foi definida a -4500V em modo negativo. O detetor MS foi programado para executar, em série, dois modos consecutivos: incrementar a análise do MS (EMS) e do ião produto (EPI). O sistema EMS foi utilizado para mostrar espectros de varrimento completo, para dar uma visão geral a todos os iões na amostra. As configurações usadas foram: potencial de não-cluster (DP) -45V, potencial de entrada (EP) -6V, energia de colisão (CE) -10V. Os espectros foram gravados em modo de ião negativo entre m/z 100 e 1500. O modo EPI foi executado, posteriormente, de modo a obter os padrões de fragmentação dos iões obtidos da experiência anterior, usando os seguintes parâmetros: DP -50 V, EP -6 V, CE -25V e espalhamento da energia de colisão (CES) 0 V.

Os compostos fenólicos foram caracterizados de acordo com os seus espectros de UV e massa, e tempo de retenção em comparação com os padrões, quando disponíveis. Para análise quantitativa, obtiveram-se as curvas de calibração por injeção de soluções-padrão com concentrações conhecidas (2,5-100 $\mu\text{g/mL}$): ácido 5-*O*-caffeoilquínico ($y=313,03x-58,20$; $R^2=0,999$); ácido *p*-cumárico ($y=884,6x+184,49$; $R^2=0,999$); catequina ($y=158,42x+11,38$; $R^2=0,999$); caempferol-3-*O*-glucósido ($y=288,55x-4,05$; $R^2=1$); caempferol-3-*O*-rutinósido ($y=239,16x-10,587$; $R^2=1$); miricetina ($y=741,41x-221,6$; $R^2=0,999$); quercetina-3-*O*-glucósido ($y=253,52x-11,615$; $R^2=0,999$); quercetina-3-*O*-rutinósido ($y=281,98x-0,3458$; $R^2=1$); siringetina 3-*O*-glucósido ($y=333,8x-189,02$; $R^2=0,999$); taxifolina ($y=478,06x-657,33$; $R^2=0,999$). Os resultados foram expressos em mg por g de folhas ou decocção (material seco, dw).

3.4. Bioatividade do extrato metanólico e da decocção

O extrato metanólico (preparado de acordo com o descrito na secção anterior) e a decocção liofilizada foram dissolvidos em i) metanol e água, respetivamente (concentração final 2,5 mg/mL) para avaliação da atividade antioxidante, ou ii) água (concentração final 8 mg/mL) para avaliação do potencial antitumoral. As soluções finais foram posteriormente diluídas a várias concentrações para serem utilizadas nos diferentes ensaios *in vitro* de avaliação de bioatividade. Os resultados foram expressos em i) valores de EC_{50} (concentração da amostra responsável por 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absóvância no ensaio do poder redutor; expressos em $\mu\text{g/mL}$ de extrato ou decocção) para a atividade antioxidante, ou ii) valores de GI_{50} (concentração da amostra responsável por 50% de inibição do crescimento celular; expressos em $\mu\text{g/mL}$ de extrato ou decocção) para a atividade antitumoral. Trolox e elipticina foram usados como controlos positivos nos ensaios de avaliação da atividade antioxidante e antitumoral, respetivamente.

3.4.1. Avaliação da atividade antioxidante

3.4.1.1. Atividade captadora de radicais livres DPPH

Misturaram-se as soluções das amostras nas várias concentrações (0,30 mL) com uma solução de metanol:água (80:20 v/v, 0,27 mL) contendo radicais de DPPH (6×10^{-5} mol/L). A mistura foi deixada em repouso durante 60 min no escuro para posterior medição da absorvância a 515 nm no leitor de microplacas ELX800 (equipamento Bio-Tek, Inc.) (Guimarães et al., 2013). A atividade captadora de radicais (RSA) foi calculada em função da percentagem da descoloração da solução de DPPH, conforme a seguinte equação: %RSA = $[(ADPPH-AS)/ADPPH] \times 100$, sendo AS a absorvância da solução na presença das várias concentrações de amostra e ADPPH a absorvância da solução de DPPH. A concentração de extrato capaz de inibir 50% de radicais DPPH (EC₅₀) foi calculada a partir do gráfico de percentagem RSA em função da concentração de amostra.

3.4.1.2. Poder redutor

As soluções das amostras nas várias concentrações (0,5 mL) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/L, pH 6,6, 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1%, 0,5 mL). As amostras foram incubadas a 50 °C durante 20 min e adicionou-se posteriormente ácido tricloroacético (10%, 0,5 mL). O sobrenadante (0,8 mL) foi colocado numa microplaca de 48 poços juntamente com água destilada e cloreto de ferro (0,1%, 0,16 mL) (Guimarães et al., 2013). A absorvância foi medida a 690 nm, no leitor de microplacas, referido anteriormente. A concentração de amostra que fornece 0,5 de absorvância foi calculada a partir do gráfico de absorvância 690 nm em função da concentração da amostra.

3.4.1.3. Inibição da descoloração do β-caroteno

Preparou-se uma solução de β-caroteno (2 mg) em clorofórmio, transferindo se 2 mL desta solução para um balão de fundo redondo para remoção do clorofórmio a 40 °C, sob vácuo. Adicionaram-se o ácido linoleico (40 mg), o emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada, agitando-se vigorosamente. Transferiram-se 4,8 mL desta solução para cada tubo de ensaio contendo as soluções das amostras nas várias concentrações (0,2 mL) (Guimarães et al., 2013). Agitaram-se os tubos homogeneizando a mistura e mediu-se, imediatamente, a absorvância a 470 nm no tempo zero. Para a medição do tempo 1 colocaram se os tubos em banho (50 °C, 2h) com agitação (50 rpm). A inibição da descoloração do β-caroteno foi

calculada em função da equação: β -caroteno (tempo 1)/ β -caroteno (tempo 0)x100. A concentração de amostra capaz de inibir 50% da oxidação (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico de percentagem de inibição da descoloração do β -caroteno em função da concentração da amostra.

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

Utilizou-se tecido cerebral de porco (*Sus scrofa*) ao qual se adicionou tampão tris-HCl (20 mL, pH 7,4) num tubo de falcon, em gelo, numa porção de 1:2 (w/v). Procedeu se à centrifugação da suspensão a 3500 g durante 10 min. Incubou-se o sobrenadante (0,1 mL) com as soluções das amostras nas várias concentrações (0,2 mL), sulfato de ferro (100 μ M, 0,1 mL) e ácido ascórbico (0,1 mM, 0,1 mL) a 37 °C durante 1h. Posteriormente, adicionou-se o ácido tiobarbitúrico (TBA, 2% w/v, 0,38 mL). A mistura foi aquecida a 80 °C durante 20 min e centrifugada a 3000 rpm durante 5 min de modo a precipitar os resíduos formados pelas reações (Guimarães et al., 2013). A absorvância foi lida a 532 nm. A percentagem da inibição da peroxidação lipídica foi calculada em função da fórmula $[(A-B)/A] \times 100$, sendo A e B a absorvância do controlo e da solução com a amostra, respetivamente. A concentração de amostra capaz de inibir 50% da peroxidação lipídica (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de amostra.

3.4.2. Avaliação do potencial antitumoral e citotoxicidade

3.4.2.1. Atividade antiproliferativa em linhas celulares tumorais humanas

Foram utilizadas cinco linhas celulares tumorais humanas: MCF-7 (adenocarcinoma de mama), NCI-H460 (câncer de pulmão), HCT-15 (carcinoma de cólon), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular). As células foram mantidas em cultura aderentes em meio RPMI-1640 contendo 10% de Soro Fetal de Bovino (SFB) inativado pelo calor e 2 mM de glutamina (MCF-7, NCI-H460 e HCT-15) ou em DMEM suplementado com 10% FBS, 2 mM glutamina, 100 U/mL penicilina e 100 mg/mL de estreptomicina (HeLa e HepG2), a 37 °C, em incubadora com temperatura humidificada contendo 5% de CO₂ (HF 151, Heal Force) (Guimarães et al., 2013). Todas as experiências foram realizadas em ambiente asséptico numa câmara de fluxo laminar vertical (TLStar, AV-30/70). Retirou-se o meio de cultura de cada caixa de cultura com as respetivas linhas celulares. Adicionou-se o

meio de lavagem (HBSS, 2 mL) e após a sua remoção adicionou-se tripsina (1,5 mL). A caixa de cultura foi colocada na incubadora durante 3 min para desagregação das células. Adicionou-se rapidamente meio de cultura (3 mL) para inativar a tripsina. Pipetou-se a suspensão celular para um tubo de falcon estéril para centrifugar (1200 rpm, 5 min.). Retiraram-se 50 μL de suspensão e adicionaram-se 50 μL de solução de azul tripano para contagem do número de células numa câmara de Neubauer.

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

3.4.2.2. Hepatotoxicidade em células não tumorais

Preparou-se uma cultura de células primárias a partir de fígado fresco de porco, obtido num matadouro local, designada por PLP2 (porcine liver primary cell culture). O procedimento foi descrito anteriormente pelo grupo de investigação em que se insere este trabalho (Abreu et al., 2011). Os tecidos foram lavados em solução salina de Hank contendo 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina e dividido em explantes de $1 \times 1 \text{ mm}^3$. Os explantes foram colocados em caixas de cultura com meio DMEM suplementado com SFB (10%), 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de estreptomicina, e colocou-se na incubadora. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, monitorizando-se utilizando um microscópio invertido (Icon Eclipse Ts 100). As células foram transferidas para uma placa de 96 poços com uma densidade de 1×10^4 células/poço, e cultivadas em meio DMEM com 10% de SFB, 100 U/mL de penicilina e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de

estreptomicina. As células foram tratadas com diferentes concentrações de amostra e efectuou-se o teste SRB descrito anteriormente.

3.4.3. Análise estatística

Utilizaram-se, para cada preparação, três amostras e todos os ensaios foram realizados em triplicado. Os resultados foram expressos em valores médios e desvios-padrão (SD). Os resultados foram analisados por uma análise de varância (ANOVA) seguida de teste HSD Tukey's com $\alpha = 0.05$. Este tratamento estatístico foi realizado por SPSS v. 18.0.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Identificação e quantificação

4.1.1. Ácidos orgânicos

Foram identificados cinco ácidos orgânicos diferentes, sendo o ácido málico, o mais abundante, principalmente nas folhas (1,04 g/100 g dw, **Tabela 2**), seguidos pelos ácidos oxálico e cítrico.

Tabela 2. Ácidos orgânicos em folhas e decocção de *Juglans regia* (média \pm DP).

Ácidos orgânicos (g/100 g, dw)	Folhas	Decocção
Ácido oxálico	0,93 \pm 0,07 ^a	0,85 \pm 0,00 ^b
Ácido málico	1,04 \pm 0,02 ^a	0,83 \pm 0,01 ^b
Ácido ascórbico	0,20 \pm 0,01	nd
Ácido xiquímico	0,10 \pm 0,00 ^a	0,06 \pm 0,00 ^b
Ácido cítrico	0,89 \pm 0,01 ^a	0,71 \pm 0,00 ^b
Total ácidos orgânicos	3,16 \pm 0,09 ^a	2,44 \pm 0,01 ^b

nd- não detetado. Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

As folhas (material seco) apresentaram maior teor de ácidos orgânicos individuais e totais (3,16 g/100 g dw, **Tabela 2**) do que a decocção obtida a partir das mesmas. Já o ácido ascórbico não foi detetado na decocção, provavelmente devido ao processo de aquecimento que pode levar à sua degradação (**Figura 5**).

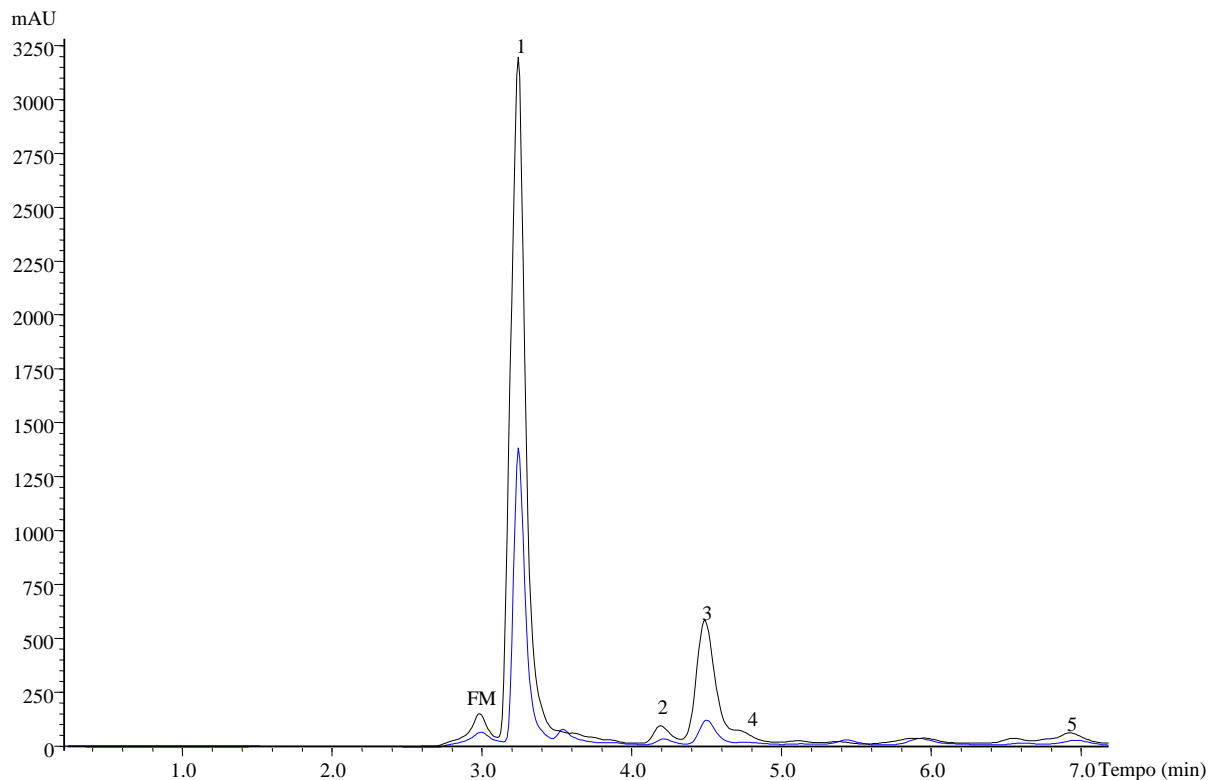


Figura 5. Perfil individual de ácidos orgânicos em folhas (—) e decocção (---) de *J. regia*: FM- fase móvel; 1- ácido oxálico; 2- ácido málico; 3- ácido xiquímico; 4- ácido ascórbico; 5- ácido cítrico.

4.1.2. Mono e oligossacáridos

Dois monossacáridos, frutose e glucose, e dois oligossacáridos, sacarose e trealose foram identificados e quantificados em ambas as amostras (**Tabela 3**). A sacarose foi o açúcar livre mais abundante, tanto nas folhas como na sua decocção (5,79 e 10,10 g/100 g dw, respetivamente, **Tabela 3**).

Tabela 3. Mono e oligossacáridos em folhas e decocção de *Juglans regia* (média \pm DP).

Mono e oligossacáridos (g/100 g, dw)	Folhas	Decocção
Frutose	nd	2,08 \pm 0,03
Glucose	0,79 \pm 0,01 ^b	3,47 \pm 0,19 ^a
Sacarose	5,79 \pm 0,35 ^b	10,10 \pm 0,23 ^a
Trealose	2,69 \pm 0,05 ^a	2,12 \pm 0,21 ^a
Total açúcares	9,27 \pm 0,31 ^b	17,17 \pm 0,61 ^a

nd- não detetado. Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

A decocção apresentou um maior teor em açúcares totais e individuais (**Figura 6**), com exceção da trealose. Os níveis mais altos de mono e oligossacáridos observados na decocção podem ser uma consequência da hidrólise de polissacáridos relacionada com o processo de calor envolvido na sua obtenção.

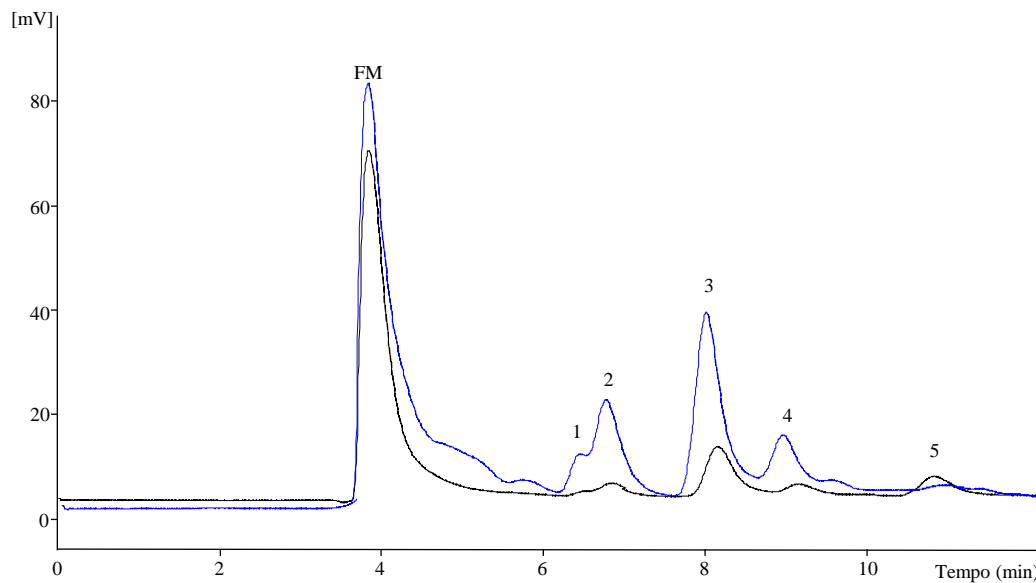


Figura 6. Perfil individual de mono e oligossacáridos em folhas (—) e decocção (---) de *J. regia*: FM- fase móvel; 1- frutose; 2- glucose; 3- sacarose; 4- trealose; 5- melezitose (PI).

4.1.3. Tocoferóis

As quatro isoformas de tocoferóis estavam presentes quer nas folhas quer na decocção (**Tabela 4**).

Tabela 4. Tocoferóis em folhas e decocção de *Juglans regia* (média \pm DP).

Tocoferóis (mg/100 g, dw)	Folhas	Decocção
α – tocoferol	199,99 \pm 1,48 ^a	3,99 \pm 0,01 ^b
β – tocoferol	2,63 \pm 0,20 ^a	0,35 \pm 0,01 ^b
γ – tocoferol	120,16 \pm 5,87 ^a	1,24 \pm 0,01 ^b
δ – tocoferol	67,56 \pm 0,36 ^a	20,26 \pm 0,11 ^b
Total tocoferóis	282,20 \pm 1,90 ^a	25,84 \pm 0,10 ^b

nd- não detetado. Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

As folhas apresentaram maior concentração no total (282,20 mg/100 g dw, Tabela 3) e de tocoferóis individuais do que a decocção obtida a partir delas (**Figura 7**). Isto poderia ser explicado pela oxidação dos tocoferóis induzida pelo calor no processo de preparação da decocção. O α -tocoferol foi a isoforma mais abundante (199,99 mg/100 g dw).

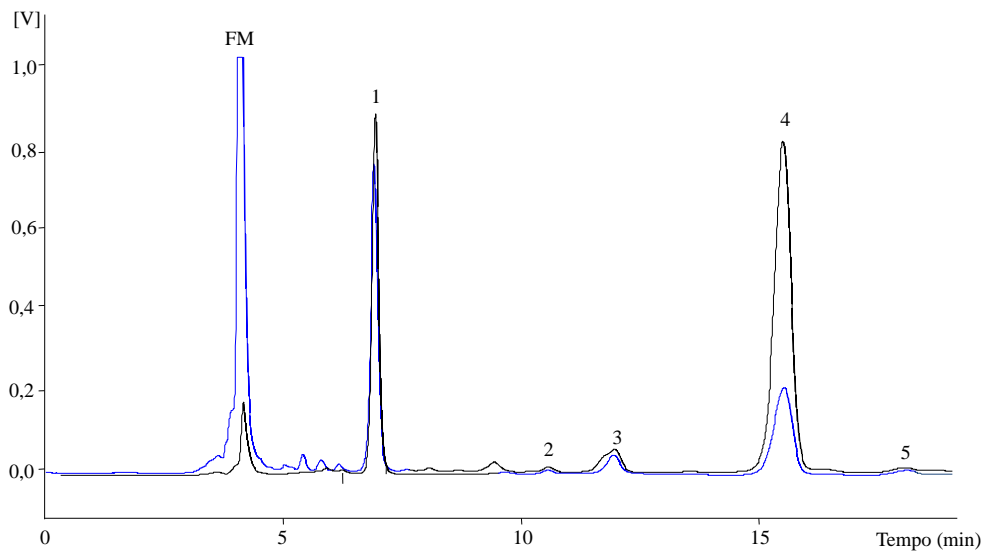
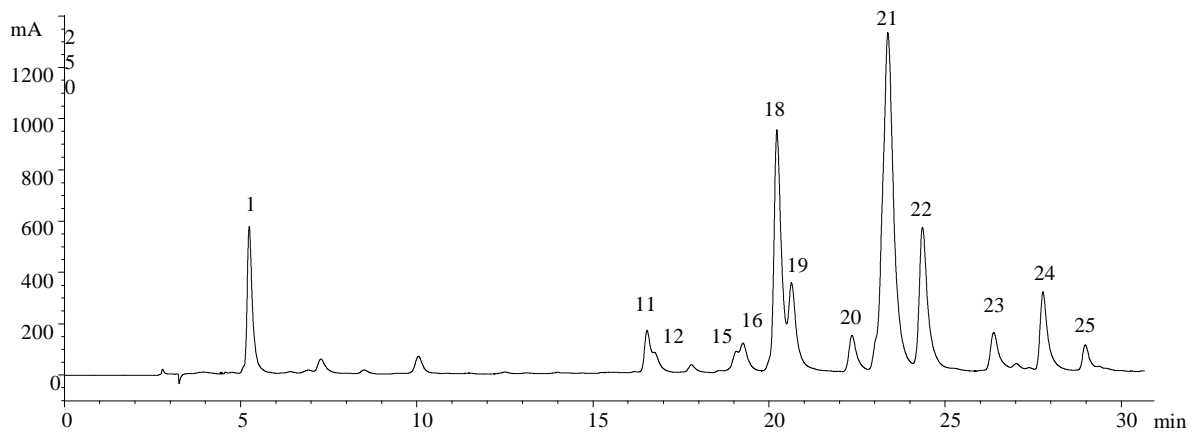


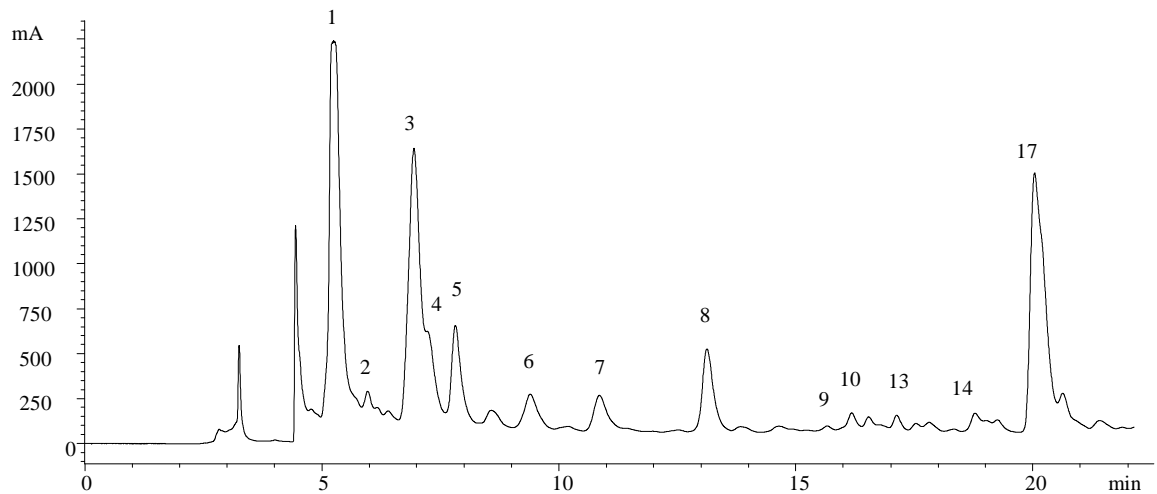
Figura 7. Perfil individual de tocoferóis em folhas (—) e decocção (---) de *J. regia*: FM- fase móvel; 1- α -tocoferol; 2- β -tocoferol; 3- γ -tocoferol; 4- δ -tocoferol; 5- Tocol (PI). A amostra de folhas foi diluída 1:4 (v/v).

4.1.4. Compostos fenólicos

O perfil fenólico das folhas de *J. regia* (após extração metanólica) e da sua decocção foi registado a 280 nm e 370 nm, e apresenta-se na **Figura 8**. As características dos picos e as tentativas de identificação são apresentados na **Tabela 5**.



(A)



(B)

Figura 8. Perfil individual de compostos fenólicos em folhas de *J. regia*, obtido a 370 nm (A) e 280 nm.

Tabela 5. Tempo de retenção (Rt), comprimentos de onda de absorção máxima na zona do visível (λ_{\max}), dados do espectro de massa e Identificação provisória de compostos fenólicos em folhas e decocção de *Juglans regia*.

Pico	Rt (min)	λ_{\max} (nm)	Ião molecular [M-H] ⁻ (m/z)	MS2 (m/z)	Identificação
1	5,26	323	353	191(100),179(89),173(20),135(78)	Ácido 3- <i>O</i> -Cafeoilquinico
2	5,97	280	577	451(34),425(55),407(92),289(75),287(16)	Dímero Procianidina
3	6,94	310	337	191(100),173(29),163(98),155(17),137(2)	Ácido 3- <i>p</i> -Coumaroilquinico
4	7,22	331	353	191(76),179(97),173(100),135(96)	Ácido 4- <i>O</i> -Cafeoilquinico
5	7,81	280	865	739(8),713(17), 695(9), 577(4), 575(6), 425(3),407(2), 289(100)	Trímero Procianidina
6	9,40	310	337	191(23), 173(100), 163(2), 155(10), 137(9)	Ácido <i>cis</i> 4- <i>p</i> -Coumaroilquinico
7	10,86	311	337	191(5), 173(100), 163(62), 155(14), 137(19)	Ácido <i>trans</i> 4- <i>p</i> -Coumaroilquinico
8	13,83	279	577	451(90),425(73),407(100),289(80),287(17)	Dímero Procianidina
9	15,66	291	435	303(20),285(100)	Isómero Taxifolina <i>O</i> -pentósido
10	16,17	291	435	303(9),285(100)	Isómero Taxifolina <i>O</i> -pentósido
11	16,53	353	479	317(100)	Miricetina 3- <i>O</i> -glucosido
12	16,72	354	493	331(100)	Laricitrina <i>O</i> -hexósido
13	17,53	292	435	303(41),285(100)	Isómero Taxifolina <i>O</i> -pentósido
14	18,78	294	435	303(56),285(100)	Isómero Taxifolina <i>O</i> -pentósido
15	19,07	356	449	317(100)	Miricetina <i>O</i> -pentósido
16	19,25	350	463	317(100)	Miricetina <i>O</i> -ramnósido
17	20,04	294	435	303(35),285(100)	Isómero taxifolina <i>O</i> -pentósido
18	20,23	354	463	301(100)	Quercetina 3- <i>O</i> -glucósido

19	20,64	354	463	301(100)	Quercetina <i>O</i> -hexósido
20	22,36	354	433	301(100)	Quercetina <i>O</i> -pentósido
21	23,37	353	433	301(100)	Quercetina <i>O</i> -pentósido
22	24,36	350	447	301(100)	Quercetina <i>O</i> -ramnósido
23	26,78	348	417	285(100)	Campferol <i>O</i> -pentósido
24	27,77	349	417	285(100)	Campferol <i>O</i> -pentósido
25	28,97	346	431	285(100)	Campferol <i>O</i> -ramnósido

Foram detetados vinte e cinco compostos, cinco dos quais eram derivados de ácidos fenólicos (derivados hidroxicinâmicos). Entre eles, dois compostos (picos 1 e 4) eram derivados do ácido cafeoilquínico identificados de acordo com os seus espetros de UV e iões pseudomoleculares. O pico 1 ($[MH]^-$ a m/z 353) foi identificado como ácido 3-*O*-cafeoilquínico, obtendo-se o pico de base a m/z 191 e o ião molecular a m/z 179, com uma intensidade de pico de base $>70\%$, característica dos ácidos 3-acilclorogénicos, tal como descrito por Clifford et al. (2003 e 2005). O pico 4 foi facilmente distinguido dos outros dois isómeros pelo seu pico de base a m/z 173 [ácido quínico- $H-H_2O$], acompanhado por um ião secundário com fragmento a m/z 179 com cerca de 97% de abundância do pico de base, o qual permitiu identificá-lo como o ácido 4-*O*-cafeoilquínico de acordo com o padrão de fragmentação descrito por Clifford et al. (2003, 2005). Os três sinais a m/z 337, também foram detetados (picos 3, 6 e 7); estes compostos foram tentativamente identificados de acordo com a sua fragmentação MS^2 como diferentes isómeros do ácido *p*-cumaroilquínico. As identidades foram atribuídas com base nos padrões descritos para os isómeros do ácido cafeoilquínico. O pico 3 foi identificado como ácido 3-*p*-cumaroilquínico, obtendo-se o pico de base a m/z 191, como descrito por Clifford et al. (2003 e 2005). A fragmentação dos picos 6 e 7 originou um ião maioritário MS^2 a m/z 173, correspondente ao ácido 4-*p*-cumaroilquínico, sendo o pico 7 associado ao isómero *trans*, ao passo que o pico 6 de características espectrais e massa semelhante foi atribuído ao ácido *cis* 4-*p*-cumaroilquínico.

A atribuição foi feita com base na sua ordem relativa de eluição; como seria esperado os derivados *cis* hidroxicinamoíl eluíram antes que os correspondentes *trans*, como observado após irradiação com UV (366 nm, 24 h) de ácidos hidroxicinâmicos no laboratório.

Os oligómeros de procianidina também foram detetados, correspondendo aos picos 2, 5 e 8, que mostraram espetros de UV com λ_{max} 279-280 nm, característicos das proantocianidinas. Os picos 2 e 8 apresentaram um ião pseudo molecular correspondente a dímeros de procianidina ($[M-H]^-$ a m/z 577) e o pico 5 a um trímero de procianidina ($[M-H]^-$ a m/z 865).

Os picos 9, 10, 13, 14 e 17 foram atribuídos a derivados de taxifolina com base no seu espetro de UV e ião pseudo molecular $[M-H]^-$ a m/z 435, libertando um fragmento a m/z 303 [taxifolina- H] $^-$ (-132 um, perda da fração pentosilo). Foram

tentativamente identificados como taxifolina *O*-pentósido que poderiam corresponder tanto a diferentes estereoisómeros, dada a natureza assimétrica da C-2 e C-3 de taxifolina (i.e., di-hidroquercetina), como a diferentes padrões de substituição do açúcar. A análise de ESI/MS não permitiu a obtenção de informação sobre a natureza e a posição das frações de açúcar.

Os compostos fenólicos restantes correspondem a derivados de flavonóides, derivados da quercetina (λ_{\max} cerca de 350 nm e um fragmento de MS^2 a m/z 301), do campferol (λ_{\max} cerca de 348 nm e um fragmento de MS^2 a m/z 285), da miricetina (λ_{\max} cerca de 354 nm e um fragmento de MS^2 a m/z 317) e da 3'-*O*-metilmiricetina (laricitrina; λ_{\max} a 354 nm e um fragmento de MS^2 a m/z 331) (Tabela 2). A miricetina 3-*O*-glicósido (pico 11) e a quercetina 3-*O*-glicósido (pico 18) foram identificadas positivamente de acordo com a sua retenção, massa e características de UV-vis por comparação com padrões comerciais.

Os picos 19 e 20 ($[M-H]^-$ a m/z 463), e 21 e 22 ($[M-H]^-$ a m/z 433 e 447, respetivamente) foram assinalados como derivados da quercetina; os picos 23 e 24 ($[M-H]^-$ a m/z 417), e 25 ($[M-H]^-$ a m/z 431) foram assinalados como derivados do campferol, e os picos 15 e 16 ($[M-H]^-$ a m/z 449 and 463, respetivamente) foram assinalados como derivados da miricetina. Apresentaram fragmentos MS^2 correspondentes a perdas distintas das frações hexosilo (-162 um), pentosilo (-132 um) e ramnosilo (-146 um), e uma ordem de eluição coerente com o tipo de substituintes-açúcares, de acordo com a sua polaridade esperada, apesar da posição e natureza das frações de açúcar não poder ter sido identificada, uma vez que os seus tempos de retenção não correspondiam a qualquer um dos padrões disponíveis.

O Pico 12 foi assinalado como laricitrina *O*-hexósido de acordo com os seus espetros de UV e massa; a presença de miricetina e quercetina 3-*O*-glicosiladas como flavonóides hexósidos maioritários, poderia indicar o pico 12 como sendo também um 3-*O*-glicósido.

O ácido 3-*O*-cafeoilquínico e a quercetina *O*-pentósido foram os compostos fenólicos mais abundantes no extrato metanólico e decocção (**Tabela 6**).

Tabela 6. Quantificação de compostos fenólicos no extrato metanólico e decocção de folhas de *Juglans regia* (mean±SD).

Compostos fenólicos	Extrato metanólico	Decocção
Ácido 3- <i>O</i> -Cafeoilquinico	6,41 ± 0,17	5,08 ± 0,06
Dímero Procianidina	0,34 ± 0,01	0,30 ± 0,03
Ácido 3- <i>p</i> -Coumaroilquinico	1,20 ± 0,04	0,92 ± 0,01
Ácido 4- <i>O</i> -Cafeoilquinico	0,95 ± 0,05	1,76 ± 0,06
Trímero Procianidina	1,86 ± 0,08	1,61 ± 0,01
Ácido cis 4- <i>p</i> -Coumaroilquinico	0,22 ± 0,02	0,27 ± 0,00
Ácido trans 4- <i>p</i> -Coumaroilquinico	0,19 ± 0,01	0,27 ± 0,00
Dímero Procianidina	0,17 ± 0,01	0,06 ± 0,00
Isómero Taxifolina <i>O</i> -pentósido	tr	tr
Isómero Taxifolina <i>O</i> -pentósido	0,06 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Miricetina 3- <i>O</i> -glucoside	0,13 ± 0,01	0,13 ± 0,00
Laricitrina <i>O</i> -hexósido	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01
Isómero Taxifolina <i>O</i> -pentósido	tr	0,25 ± 0,00
Isómero Taxifolina <i>O</i> -pentósido	0,05 ± 0,00	0,06 ± 0,00
Miricetina <i>O</i> -pentósido	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,01
Miricetina <i>O</i> -ramnósido	0,12 ± 0,00	0,10 ± 0,00
Isómero Taxifolina <i>O</i> -pentósido	1,50 ± 0,01	0,72 ± 0,01
Quercetina 3- <i>O</i> -glucoside	2,37 ± 0,09	2,56 ± 0,03
Quercetina <i>O</i> -hexósido	0,98 ± 0,03	0,69 ± 0,06
Quercetina <i>O</i> -pentósido	0,38 ± 0,00	0,40 ± 0,00
Quercetina <i>O</i> -pentósido	5,04 ± 0,09	4,87 ± 0,01
Quercetina <i>O</i> -ramnósido	1,77 ± 0,02	1,58 ± 0,03
Campferol <i>O</i> -pentósido	0,38 ± 0,01	0,32 ± 0,01
Campferol <i>O</i> -pentósido	0,74 ± 0,02	0,69 ± 0,03
Campferol <i>O</i> -ramnósido	0,25 ± 0,01	0,22 ± 0,00
Total ácidos fenólicos (mg/g, dw)	8,95 ± 0,27a	8,29 ± 0,01b
Total flavan-3-óis (mg/g, dw)	2,37 ± 0,08a	1,98 ± 0,02b
Total flavonóides / flavonóis (mg/g, dw)	13,98 ± 0,20a	12,55 ± 0,10b
Total compostos fenólicos (mg/g, dw)	25,30 ± 0,39a	22,82 ± 0,13b

tr- vestígios. Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Este estudo permitiu uma caracterização mais completa de compostos fenólicos de folhas de noqueira, tendo sido descritos anteriormente apenas nove (Amaral et al., 2004) e dez (Pereira et al., 2007) compostos. Wichtl e Anton (1999) e Cheniany et al. (2013), descreveram a presença de outros ácidos fenólicos tais como o cafeico, ferúlico, *p*-cumárico, *p*-hidroxifenilacético, gálico e salicílico, nas folhas e microestacas de *J. regia*. Pereira et al. (2007) e Amaral et al. (2004) apresentaram o ácido 3-*O*-cafeoilquínico e a quercetina 3-galactósido como os principais compostos fenólicos presentes.

Tanto quanto se sabe, esta é a primeira vez que a presença de procianidinas, taxifolina e derivados de miricetina foram descritas em folhas de noqueira. Além disso, não existiam resultados da determinação fenólica em decocção, o modo de preparação mais utilizado para folhas de noqueira em etnofarmacologia. Em geral, a decocção mostrou uma concentração mais baixa dos compostos fenólicos identificados, embora a diminuição da quantidade total não tenha sido relevante (**Tabela 6**).

4.2. Bioatividade

4.2.1. Atividade antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante do extrato metanólico e decocção preparados a partir de folhas de *J. regia* são apresentados na **Tabela 7**.

Tabela 7. Bioatividade do extrato metanólico e decocção de folhas de *Juglans regia* (média±SD).

	Extrato metanólico	Decocção	Controlo positivo
Atividade antioxidante (valores EC ₅₀ , µg/mL)			
Atividade captadora DPPH	65,91 ± 6,47 ^b	78,97 ± 5,61 ^a	43,03 ± 1,71
Poder redutor	75,87 ± 2,41 ^b	83,71 ± 1,15 ^a	29,62 ± 3,15
Inibição da descoloração do β-caroteno	189,92 ± 12,61 ^b	269,27 ± 2,33 ^a	2,63 ± 0,14
TBARS inibição	20,36 ± 0,82 ^b	114,68 ± 16,41 ^a	3,73 ± 0,74

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

O extrato metanólico apresentou menores valores de EC_{50} (maior atividade antioxidante) do que a decocção, em todos os ensaios. Ambas as amostras revelaram uma maior atividade captadora de radicais livres DPPH e poder redutor que os extratos metanólicos obtidos de diferentes cultivares portuguesas de *J. regia* ($EC_{50} = 0,151$ a $0,202$ mg/mL para a atividade captadora de radicais livres DPPH; $EC_{0,5} = 0,192-0,229$ para o poder redutor, Pereira et al., 2007; $EC_{50} = 0,199$ mg/mL para a atividade captadora de radicais livres DPPH, Carvalho et al., 2010) e de diferentes cultivares iranianos de microestacas ($EC_{50} = 0,312$ a $0,631$ mg/mL para a atividade captadora de radicais livres DPPH; $EC_{0,5} = 0,374$ a $0,668$ mg/mL para o poder redutor, Cheniany et al., 2013). Na avaliação da inibição da peroxidação lipídica, efetuada pelo ensaio β -caroteno/linoleato, os valores EC_{50} obtidos neste estudo também foram mais baixos ($EC_{50} = 189,92$ e $269,27$ mg/mL para o extrato metanólico e decocção, respetivamente) do que os valores descritos por Pereira et al. (2007) ($EC_{50} = 0,742$ a $1,645$ mg/mL).

4.2.2. Atividade antitumoral e citotoxicidade

Os efeitos do extrato metanólico e decocção sobre o crescimento de diferentes linhas celulares tumorais humanas (MCF-7, NCI-H460, HCT-15, HeLa e HepG2) foram também avaliados (**Tabela 8**). Ambas as amostras apresentaram potencial semelhante contra as linhas celulares de cancro de mama (MCF-7), cólon (HCT-15) e hepatocarcinoma (HepG2). O extrato metanólico foi mais potente contra a linha celular de carcinoma cervical (HeLa, $GI_{50} = 294,87$ mg/mL), enquanto a decocção não mostrou qualquer efeito. Nenhum dos extratos apresentou toxicidade em culturas primárias de células de fígado (PLP2).

Tabela 8. Avaliação da atividade antitumoral do extrato metanólico e decocção de folhas de *Juglans regia* (média±SD).

Atividade Antitumoral (valores GI50, µg/mL)	Extrato metanólico	Decocção	Controlo positivo
MCF-7 (adenocarcinoma de mama)	209,28±8,83 ^b	242,14±10,14 ^a	0,91±0,04
NCI-H460 (cancro de pulmão)	> 400	> 400	1,42±0,00
HCT-15 (carcinoma de colón)	215,58±0,58 ^b	258,93±11,02 ^a	1,91±0,06
HeLa (cervical carcinoma)	294,87±9,36	> 400	1,14±0,21
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	240,67±7,13 ^b	285,20±0,25 ^a	3,22±0,67
Hepatotoxicidade (valores GI50, µg/mL)			
PLP2	> 400	> 400	2,06±0,03

Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

Carvalho et al. (2010) descreveram a atividade antiproliferativa do extrato metanólico de folhas de *J. regia* usando duas linhas celulares cancerígenas renais humanas (A-498 e 769-P) e uma linha celular de cancro de cólon (Caco-2).

Embora a linha celular de cancro de cólon seja diferente da utilizada no presente estudo (HCT-15), os resultados apresentados por Carvalho et al. (2010) ($IC_{50}=229$ µg/mL) foram semelhantes aos aqui obtidos ($GI_{50}=258.93$ e 215.58 µg/mL para o extrato metanólico e decocção, respetivamente).

5. CONCLUSÕES

No geral, cinco ácidos orgânicos, dois monossacáridos, dois dissacáridos e as quatro isoformas de tocoferóis foram identificados em folhas de noqueira (*J. regia*), sendo o ácido málico, a sacarose e o α -tocoferol, os compostos mais abundante de cada classe, tanto no material vegetal seco como na decocção.

Para além disso, foram identificados e quantificados vinte e cinco compostos fenólicos: cinco derivados de ácidos fenólicos (ácido cafeoilquínico e derivados de ácido *p*-cumaroilquínico), dois dímeros e um trímero de procianidinas, doze flavonóis (quercetina, miricetina e derivados de kaempferol), e cinco isómeros de taxifolina *O*-pentósido. Os ácidos 3-*O*-cafeoilquínicos e a quercetina *O*-pentósido foram os principais compostos fenólicos encontrados em folhas de *J. regia*.

O extrato metanólico apresentou maior potencial antioxidante e antitumoral *in vitro* que a decocção; nenhuma das preparações demonstrou toxicidade em culturas primárias de células de fígado.

Este estudo fornece uma caracterização mais completa de compostos fenólicos em folhas de noqueira e, tanto quanto sabemos, é o primeiro estudo que descreve a presença de procianidinas e derivados taxifolina, bem como tocoferóis.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abbasi, A.M., Khana, M.A., Ahmad, M., Zafar M., Jahan, S., Sultana, S. (2010). Ethnopharmacological application of medicinal plants to cure skin diseases and in folk cosmetics among the tribal communities of North-West Frontier Province, Pakistan. *Journal of Ethnopharmacology* 128, 322–335.
- Abreu, R.M.V., Ferreira, I.C.F.R., Calhella, R.C., Lima, R.T., Vasconcelos, M.H., Adegá, F., Chaves, R., Queiroz, M.J.R.P. (2011). Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothieno[3,2-b]pyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR studies. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46, 5800-5806.
- Agulló, A.F., Pereira, E., Freire, M.S., Valentão, P., Andrade, P.B., Álvarez, J. G, Pereira, J.A. (2013). Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. *Industrial Crops and Products* 42, 126-132.
- Akerreta, S., Calvo, M.I., Cavero, R.Y., (2010). Ethnoveterinary knowledge in Navarra (Iberian Peninsula). *Journal of Ethnopharmacology* 130, 369-378.
- Alexiades, M.N. (Ed.), (1996). Selected Guidelines for Ethnobotanical Research: A Field Manual. *New York Botanical Garden, Bronx, NY*, 306 pp., 1-20.
- Almeida, I.F., Fernandes, E., Lima, J.L.F.C., Costa, P. C., Bahia, M.F. (2008). Walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavengers of pro-oxidant reactive species. *Food Chemistry* 106, 1014-1020.
- Amaral, J.S., Seabra, R.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Pereira, J.A., Ferreres, F. (2004). Phenolic profile in the quality control of walnut (*Juglans regia* L.) leaves. *Food Chemistry* 88, 373-379.
- Azzi, A., Breyer, I., Feher, M., Pastori, M., Ricciarelli, R., Spycher, S. (2000). Specific cellular responses to alpha-tocopherol. *Journal of Nutrition* 130, 1649-1652.
- Barros, A.I.R.N.A., Nunes, F.M., Gonçalves, B., Bennett, R.N., Silva, A.P. (2011a). Effect of cooking on total vitamin C contents and antioxidant activity of sweet chestnuts (*Castanea sativa* Mill.). *Food Chemistry* 128, 165–172.
- Barros, L., Heleno, S.A., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2010). 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. (2011b). From famine plants to tasty and fragrant spices: Three Lamiaceae of general dietary relevance in traditional cuisine of Trás-os-Montes (Portugal). *LWT - Food Science and Technology* 44, 543-548.
- Bartoli, P., Falteri, P., Loux, F., Saillant, F. (1997). “Non fissare il cielo stellato”. Le verruche nella medicina popolare in Italia, Francia e Québec. *AM Rivista della Società italiana di Antropologia Medica* 3/4, 103–144.
- Bennet-Clark, T.A. (1993). The role of the organic acids in plant metabolism. Part I. *New Phytology* 32-37.
- Benitez, G., Gonzalez-Tejero, M.R., Molero-Mesa, J. (2010). Pharmaceutical ethnobotany in the western part of Granada province (southern Spain): Ethnopharmacological synthesis. *Journal of Ethnopharmacology* 129, 87-105.
- Blanco, E., Macía, M.J., Morales, R. (1999). Medicinal and veterinary plants of El Caurel (Galicia, northwest Spain). *Journal of Ethnopharmacology* 65, 113-124.
- Block, G., Patterson, B., Subar, A. (1992). Fruit, vegetables, and cancer prevention: a review of the epidemiological evidence. *Nutrition and Cancer* 18, 1-29.
- Bravo, L. (1998). Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. *Nutrition Review* 56, 317-333.
- Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia, Fitoquímica Plantas Medicinales*. Acribia, Zaragoza.
- Burton, G.W., Traber, M.G. (1990). Vitamin E: antioxidant activity, biokinetics, and bioavailability. *Annuals Reviews of Nutrition* 10, 357-382.
- Camejo, J. R., Ascensão, L., Bonet A.M., Vallès, J. (2003). An ethnobotanical study of medicinal and aromatic plants in the Natural Park of “Serra de São Mamede” (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology* 89, 199-209.
- Caretto, S., Nisi, R., Paradiso, A., DeGara, L. (2009). Tocopherol production in plant cell cultures. *Free Radicals Research* 43, 27-97.
- Cao, G., Sofic, E., Prior, R. (1996). Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 44, 3426–3431.
- 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. Madrid: Consejo Superior de Investigaciones Científicas.
- Carvalho, M., Ferreira, P.J., Mendes, V.S., Silva, R., Pereira, J.A., Jerónimo, C., Silva, B.M., (2010). Human cancer cell antiproliferative and antioxidant activities of *Juglans regia* L. *Food and Chemical Toxicology* 48, 441-447.
- Cheniany, M., Ebrahimzadeh, H., Vahdati, K., Preece, J.E., Masoudinejad, A., & Mirmasoumi, M. (2013). Content of different groups of phenolic compounds in microshoots of *Juglans regia* cultivars and studies on antioxidant activity. *Acta Physiologiae Plantarum* 35, 443-450.
- Clifford, M.N., Johnston, K.L., Knight, S., & Kuhnert, N.A. (2003). A hierarchical scheme for LC-MSn identification of chlorogenic acids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 51, 2900-2911.
- Clifford, M.N., Knight, S., & Kuhnert, N.A. (2005). Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSn. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53, 3821-3832.
- Cunha, A.P. (2005). *Farmacognosia e Fitoquímica*. Fundação Calouste Gulbenkian.
- Cunha, A.P.; Silva, A.P.; Roque, O.R. (2006). *Plantas e produtos vegetais em fitoterapia*. Fundação Calouste Gulbenkian.
- Cunha, A.P., Silva, A.P., Roque, O.D., Cunha, E., (2008). *Plantas e produtos vegetais em cosmética e dermatologia*. Fundação Calouste Gulbenkian pp. 51-52.
- Duarte, T.L., Lunec, J. (2005). Review: when is an antioxidant not an antioxidant? A review of novel actions and reactions of vitamin C. *Free Radicals Research* 39, 671-686.
- Dweck, A.C; FLS; FRSC; FRSK, 2009. The internal and external use of medicinal plants. *Clinics in dermatology* 27, 148-158
- Erdemoglu, N., Küpeli, E., Yesilada, E. (2003). Anti-inflammatory and antinociceptive activity assessment of plants used as remedy in Turkish folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 89, 123-129.
- Fang, Y.-Z., Yang, S., Wu, G. (2002). *Free radicals, antioxidants, and nutrition*. *Nutrition* 18, 872-879.
- Ferreira, I.C.F.R. (2011). *Biomoléculas em cogumelos silvestres: Estudo de caso. Lição de Agregação*. Universidade do Minho.

- Ferreira, I.C.F.R., Barros, L., Abreu, R.M.V. (2009) Antioxidants in Wild Mushrooms. *Current Medicinal Chemistry* 16, 1543-1560.
- Galleano, M., Verstraeten, S. V., Oteiza, P. I., Fraga, C.G. (2010). Antioxidant actions of flavonoids: thermodynamic and kinetic analysis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 501, 23-30.
- Garmendia, M.F., Navarro, C. Juglans L. in Castroviejo, S. (Coord. Gen.). Flora Iberica IX.: Real Jardín Botánico, CSIC, Madrid. <http://www.floraiberica.org/> (janeiro de 2013).
- Gebre, G.M., Kuhns, M.R., Brandle, J.R. (1994) Organic solute accumulation and dehydration tolerance in three water-stresses *Populus deltoids* clones. *Tree Physiology* 14, 575–587.
- George, S.; Brat, P.; Alter, P.; Amiot, M.J. (2005). Rapid determination of polyphenols and vitamin C in plant-derived products. *Journal Agriculture Food Chemistry* 53, 1370-1373.
- Giada, M.L., Filho, J.M. (2006). The importance of dietary phenolic compounds in the promotion of human health. *Biology and Health Science* 12, 7–15.
- González, J.A., García-Barriuso, M., Amich, F. (2010). Ethnobotanical study of medicinal plants traditionally used in the Arribes del Duero, western Spain. *Journal of Ethnopharmacology* 131, 343-355.
- Grabner, E. (1963). The "Sacred Fire". "St. Anthony's fire", erysipelas, and "Rose" is volksstümliche disease names and their treatments in folk medicine. *Austrian Journal of Folklore* 17, 77-95.
- Guarrera, P.M. (2005). Traditional phytotherapy in Central Italy (Marche, Abruzzo, and Latium). *Fitoterapia* 76, 1-25.
- Guimarães, R., Barros, L., Carvalho, A.M., Sousa, M.J., Morais, J.S., Ferreira, I.C.F.R., (2009). Aromatic plants as a source of important phytochemicals: Vitamins, sugars and fatty acids in *Cistus ladanifer*, *Cupressus lusitanica* and *Eucalyptus gunnii* leaves. *Industrial Crops and Products* 30, 427-430.
- Guimarães, R., Barros L., Duenas, M., Calhella, R.C., Carvalho, A.M., Santos-Buelga, C., Queiroz, R.P.M.J., Ferreira, I.C.F.R. (2013). Infusion and decoction of wild German chamomile: Bioactivity and characterization of organic acids and phenolic compounds. *Food Chemistry* 136, 947-954.

- Gundogdu, M., Yilmaz, H. (2012). Organic acid, phenolic profile and antioxidant capacities of pomegranate (*Punica granatum* L.) cultivars and selected genotypes. *Scientia Horticultureae* 143, 38-42.
- Halpner, A.D., Handelman, G.J., Belmont, C.A., Harris, J.M., Blumberg, J.B. (1998). Protection by vitamin C of oxidant-induced loss of vitamin E in rat hepatocytes. *Journal of Nutritional Biochemistry* 9, 355-359.
- Harshberger, J.W. (1896). The purposes of ethnobotany. *Botanical Gazette* 21, 146-154.
- Havsteen BH. 2002. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacology Therapy* 96, 67-202.
- Heimendinger, J., Van Duyn, M.A., Chapelsky, D., Foerster, S., Stables, G. (1996). The national 5 A Day for Better Health Program: a large-scale nutrition intervention. *Journal of Public Health Management Practices* 2, 27-35.
- Heinrich, M., Kufer, J., Leonti, M., Santayana, M.P. (2006). Ethnobotany and ethnopharmacology-Interdisciplinary links with the historical sciences. *Journal of Ethnopharmacology* 107, 157-160.
- Heinrich, M., Edwards, S., Moerman, D.E., Leonti, M. (2009). Ethnopharmacological field studies: A critical assessment of their conceptual basis and methods. *Journal of Ethnopharmacology* 124, 1-17.
- Hollman, P.C.H.; Arts, I.C.W. (2000). Flavonols, flavones and flavanols - nature, occurrence and dietary burden. *Journal of the Science of Food and Agricultural* 80, 1081-1093.
- Iwashina, T. (2000). The structure and distribution of the flavonoids in plants. *Journal of Plant Research* 113, 287-299.
- Jee, J., Lim, S., Park, J., Kim, C. (2006). Stabilization of all-trans retinol by loading lipophilic antioxidants in solid lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmacy and Biopharmacy* 63, 134-139.
- Jenab, M., Ferrari, P., Slimani, N., et al. (2004). Association of nut and seed intake with colorectal cancer risk in the European Prospective investigation into cancer and nutrition. *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prevention* 13, 1595-1603.
- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., Vuorela, H. J., Rauha, J.P., Pihlaja, K., Kujala, T. S., Heinonen, M. (1999). Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 47, 3954-3962.

- Kim, D. I., Lee, S. J., Lee, S. B., Park, K., Kim, W. J., Moon, S. K. (2008). Requirement for Ras/Raf/ERK pathway in naringin-induced G1-cell-cycle arrest via p21WAF1 expression. *Carcinogenesis* 29, 1701-1709.
- Kneedler, J.A., Sky, S.S., Sexton, L.R. (1998). Understanding alphahydroxy acids. *Dermatology Nurs* 10, 247-254.
- Lamberg L. (1998). “Treatment” cosmetics: Hype or help? *Journal of the American Medical Association* 279, 1595-1596.
- Lans, C. (2001). Creole remedies: case studies of ethnoveterinary medicine in Trinidad and Tobago. *Wageningen University, Wageningen*. Thesis Wageningen.
- Leonti, M. (2011). The future is written: Impact of scripts on the cognition, selection, knowledge and transmission of medicinal plant use and its implications for ethnobotany and ethnopharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 134, 542-555
- Liu, F., Ooi, V. E. C., Chang, S. T. (1997). Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. *Life Sciences* 60, 763–771.
- Liu, R.H. (2004). Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. *Journal Nutrition* 134, 3479-3485.
- Lobo, V., Phatak, A., Chandra, N. (2010). Free radicals and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy Reviews* 4, 118–126.
- Lü, J., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C. (2010). Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 14, 840–860.
- Luo, G., Guan, X., Zhou, L. (2008). Apoptotic effect of citrus fruit extract nobiletin on lung cancer cell line A549 in vitro and in vivo. *Cancer Biology & Therapy* 7, 966-973.
- Mathew, A., Peters, U., Chatterjee, N., Kulldorff, M., Sinha, R. (2004). Fat, fiber, fruits, vegetables, and risk of colorectal adenomas. *International Journal of Cancer* 108, 287–292.
- Middleton, Jr. E., Kandaswami, C., Theoharides, T.C. (2000). The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. *Pharmacological Reviews* 52, 673–751.

- Mladenka, P., Zatloukalová, L., Filipky, T., Hrdina, R. (2010). Cardiovascular effects of flavonoids are not caused only by direct antioxidant activity. *Free Radical Biology & Medicine* 49, 963–975.
- Molnár-Perl, I. (2000). Role of chromatography in the analysis of sugars, carboxylic acids and aminoacids in food. *Journal of Chromatography A* 891, 1–32.
- Mucha, A.P., Almeida, C.M.R., Bordalo, A.A., Vasconcelos, M.T.S.D. (2005). Exudation of organic acids by a marsh plant and implications on trace metal availability in the rhizosphere of estuarine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 65, 191-198.
- Muir, J. G., Rose, R., Rosella, Q., Liels, K., Barrett, J. S., Shepherd, S. J., et al. (2009). Measurement of short-chain carbohydrates in common Australian vegetables and fruits by high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of the Science of Food and Agriculture* 57, 554–565.
- Natale, D.A., Pollio, A. (2007). Plants species in the folk medicine of Montecorvino Rovella (inland Campania, Italy). *Journal of Ethnopharmacology* 109, 295-303.
- Neves, J.M, Matos, C., Moutinho, C., Queiroz, G., Gomes, L.R. (2009). Ethnopharmacological notes about ancient uses of medicinal plants in Tras-os-Montes (northern of Portugal). *Journal of Ethnopharmacology* 124, 270-283.
- Nijveldt, R.J., van Nood, E., van Hoorn, D.E.C., Boelens, P.G., van Norren, K., van Leeuwen, P.A.M. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *American Journal of Clinical Nutrition* 74, 418-425.
- Nogueira, I.A.L., Leão, A.B.B., Vieira, M.S., Benfica, P.L., Cunha, L.C., Valadares, M.C., (2008). Antitumoral and antiangiogenic activity of *Synadenium umbellatum* Pax. *Journal of Ethnopharmacology* 120, 474–478.
- Novais, M.H., Santos, I., Mendes, S., Pinto-Gomes, C. (2004). Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). *Journal of Ethnopharmacology* 93, 183-195.
- Oliveira, A.P, Pereira, J.A, Andrade, P.B., Valentão, P, Seabra, R.M, Silva, B.M. (2008b). Organic acids composition of *Cydonia oblonga* Miller leaf. *Food Chemistry* 111, 393-399.

- Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I., Bento, A., Estevinho, L., Pereira, J.A. (2008a). Total phenols, antioxidant potential and antimicrobial activity of walnut (*Juglans regia* L.) green husks. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2326-2331.
- Paiva, S.A.R., Russell, R.M. (1999). β -Carotene and other carotenoids as antioxidants. *Journal of American College of Nutrition* 18, 426-433.
- Palace, V.P., Khaper, N., Qin, Q., Singal, P.K. (1999). Antioxidant potentials of vitamin A and carotenoids and their relevance to heart disease. *Free Radicals in Biology and Medicine* 26, 746-761.
- Paulus, A., Klockow, A. (1996). Determination of carbohydrates by capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography A* 720, 353-376.
- Park, K., Park, H.S., Nagappan, A., Hong, G.E., Lee, D.H., Kang, S.R., Kim, J.A., Zhang, J., Kim, E.H., Won Sup Lee, W.S., Shin, S.C., Hah, Y.S., Kim, G.S. (2012). Induction of the cell cycle arrest and apoptosis by flavonoids isolated from Korean Citrus aurantium L. in non-small-cell lung cancer cells. *Food Chemistry* 135, 2728-2735.
- Parry, J., Su, L., Moore, J., Cheng, Z., Luther, M., Rao, J.N., Wang, J.Y., Yu, L. (2006). Chemical compositions, antioxidant capacities, and antiproliferative activities of selected seed flours. *Journal Agriculture Food Chemistry* 54, 3773-3778.
- Pereira, C., Barros, L., Carvalho, A.M, Ferreira, I.C.F.R. (2012). Use of UFLC-PDA for the analysis of organic acids in thirty-five species of food and medicinal plants. *Food Analytical Methods*, doi 10.1007/s12161-012-9548-6.
- Pereira, J.P., Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L. (2008). Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food and Chemical Toxicology* 46, 2103-2111.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P.B., Ferreira, I., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R.M., Estevinho, L. (2007). Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antibacterial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chemical and Toxicology* 45, 2287-2295.
- Pieroni, A., Quave, C.L., Villanelli, M.L., Manginod P., Sabbatini, G., Santini, L., Boccetti, T., Profili, M., Tamara Ciccio, T., Rampad, L.G., Antonini, G., Girolamini, C., Cecchi, M., Tomasi, M. (2004). Ethnopharmacognostic survey on the natural ingredients used in folk cosmetics, cosmeceuticals and remedies

- for healing skin diseases in the inland Marches, Central-Eastern Italy. *Journal of Ethnopharmacology* 91, 331-344.
- Pinnell, S.R. (2003). Cutaneous photodamage, oxidative stress, and topical antioxidant protection. *Journal American Academy of Dermatology* 48, 1-22.
- Poyrazoglu, E., Gokmen, V., Artik, N. (2002). Organic acids and phenolic compounds in pomegranates (*Punica grgranatum* L.) grown in Turkey. *Journal of Food Composition and Analysis* 14, 567-575.
- Quah, S.R., Slikkerveer, L.J. (2003). Traditional healing systems: negotiating science and technology challenges. Nus, Singapore. *Indigenous Knowledge Systems Research & Development Studies*, nº4.
- Quave, C, Pieroni, A. (2001). Magical healing. Traditional folk-medical practices of the Vulture area of southern Italy. In: Gottschalk-Batschkus, C.E., Green, J. C. (Eds.), *Handbuch der Ethnotherpaien/Handbook of Ethnotherapies*. BOD Verlag, Hamburg, Germany, pp. 109-188.
- Rafael, M; Barros, L., Carvalho, A.M., Ferreira, I.C.F.R. (2011). Topical anti-inflammatory plant species: Bioactivity of *Bryonia dioica*, *Tamus communis* and *Lonicera periclymenum* fruits. *Industrial crops and products* 34, 1447-1454.
- Rahman, K. (2007). Studies on free radicals, antioxidants and co-factors. *Clinical Interventions in Aging* 2, 219-236.
- Reddy, L., Odhav, B., Bhoola, K.D. (2003). Natural products for cancer prevention: a global perspective. *Pharmacology Therapy* 99, 1-13.
- Rivier, L., Bruhn, J.G. (1979). Editorial. *Journal of Ethnopharmacology* 1, 1.
- Scherer, R., Rybca, A.C.P., Ballus, C.A., Meinhart, A.D., Filho, J.T., Godoy, H.T. (2012). Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food Chemistry* 135, 150-154.
- Schultes, R.E., von Reis, S. (Eds.), (1995). *Ethnobotany: Evolution of a Discipline*. Chapman & Hall, London, pp. 414.
- Shui, G., Leong, L. P. (2002). Separation and determination of organic acids and phenolic compounds in fruit juices and drinks by HPLC. *Journal of Chromatography A*, 977, 89-96.
- Silva, B.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R.M., Ferreira, M.A. (2004). Quince (*Cydonia oblonga* Miller) seed (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. *Journal of Agricultural Food Chemistry* 52, 4405-4712.

- Silva, B.M., Valentão, P., Seabra, R.M., Andrade, P.B. (2008). Quince (*Cydonia oblonga* Miller): an interesting dietary source of bioactive compounds. In: Papadopoulos, K.N. (Ed.), *Food Chemistry Research Developments*. Nova Science Publishers, Inc., New York, pp. 243-266.
- Singh, P.P., Chandra, A., Mahdi, F., Ray, A., Sharma, P. (2010). Reconvence and reconnect the antioxidant hypothesis in Human health and disease. *Indian Journal of Clinical Biochemistry* 25, 225–243.
- Skibola, C.F., Smith, M.T. (2000). Potencial health impacts of excessive flavonoid intake. *Free Radicals in Biology and Medicine* 29, 375-383.
- Slater, T.F. (1984). Free-radical mechanisms in tissue injury. *Biochemical Journal* 222, 1–15.
- Slikkerveer, L.J. (2001). Building bridges with traditional knowledge. Honolulu (Hawaii), 28 May-1 June 2001. *Indigenous Knowledge and Development Monitor*, 9 (2), 32 (<http://www.nuffic.nl/pdf/ciran/0701.pdf>).
- Slikkerveer L. J. (2006). The challenge of non-experimental validation of MAC plants: towards a multivariate model of transcultural utilization of medicinal, aromatic and cosmetic plants. *Medicinal and Aromatic Plants*, Springer, 1-28.
- Soejarto, D.D., Fong, H.H.S., Tan, G.T., Zhang, H.J., Ma, C.Y., Franzblau, S.G., Gyllenhaal, C., Riley, M.C., Kadushin, M.R., Pezzuto, J.M., Xuan, L.T., Hiep, N.T., Hung, N.V., Vu, B.M., Loc, P.K., Dac, L.X., Binh, L.T., Chien, N.Q., Hai, N.V., Bich, T.Q., Cuong, N.M., Southavong, B., Sydara, K., Bouamanivong, S., Ly, H.M., Thuy, T.V., Rose, W.C., Dietzman, G.R. (2005). Ethnobotany/ethnopharmacology and mass bioprospecting: Issues on intellectual property and benefit-sharing. *Journal of Ethnopharmacology* 100, 15-22.
- Stampar, F., Solar, A., Hudina, M., Veberic, R., Colaric, M. (2006). Traditional walnut liqueur–cocktail of phenolics. *Food Chemistry* 95, 627-631.
- Sun, J., Chu, Y.F., Wu, X., Liu, R. (2002). Antioxidant and antiproliferative activities of common seeds. *Journal Agriculture Food Chemistry* 50, 7449-7454.
- Vaughan, J.G., Geissler, C.A. (1997). *The New Oxford Book of Food Plants*. Oxford University Press, New York, p 196.
- Verma, R.S., Padalia, R.C., Chauhan, A., Thul, S.T. (2013). Phytochemical analysis of the leaf volatile oil of walnut tree (*Juglans regia* L.) from western Himalaya. *Industrial Crops and Products* 42, 195-201.

- Wichtl, M., Anton, R. (1999). *Plantes therapeutiques*. Paris: Tec. & Doc. (pp. 291–293).
- Wiernsperger, N.F., (2003). Oxidative stress as a therapeutic target in diabetes: revisiting the controversy. *Diabetes and Metabolism* 29, 579-585.
- WHO, 2007. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs134/en/>.
- 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 American Chemical Society* 123, 1173-1183.
- Yang, J., Liu, R., Halim, L. (2009). Antioxidant and antiproliferative activities of common edible nut seeds. *Food Science Technology* 42, 1-8.
- Zhang, S., Yang a, X., Coburn, R.A., Morris, M.E. (2005). Structure activity relationships and quantitative structure activity relationships for the flavonoid-mediated inhibition of breast cancer resistance protein. *Biochemical Pharmacology* 70, 627-639.

7. ANEXOS

Os resultados descritos nesta dissertação deram origem à publicação de um artigo numa revista indexada à ISI web of knowlege e a duas apresentações em poster em congressos nacionais:

- André Santos, Lillian Barros, Ricardo C. Calhelha, Montserrat Dueñas, Ana Maria Carvalho, Celestino Santos-Buelga, Isabel C.F.R. Ferreira. Leaves and decoction of *Juglans regia* L.: different performances regarding bioactive compounds and in vitro antioxidant and antitumor effects. *Industrial Crops and Products*, 2013, in press.

- André Santos, Lillian Barros, Montserrat Dueñas, Ana Maria Carvalho, Celestino Santos-Buelga, Isabel C.F.R. Ferreira. *Juglans regia* L. leaves as a source of bioactive phenolic compounds. 1st Symposium on Medicinal Chemistry of University of Minho. 17 de Maio de 2013, Braga, Portugal; PC-74; 91p.

- André Santos, Ângela Fernandes, Lillian Barros, Ana Maria Carvalho, Isabel C.F.R. Ferreira. Antioxidant potential of three medicinal species of topical traditional use in Northeastern Portugal: *Juglans regia* L., *Malva neglecta* Walt. and *Scrophularia scorodonia* L. 1st Symposium on Medicinal Chemistry of University of Minho. 17 de Maio de 2013, Braga, Portugal; PC-75; 92p.