

Avaliação da bioatividade de quatro lenhinas técnicas: Alcell, Indulin-AT, Sarkanda e Curan 27-11P

Maria Azucena Marques Gamallo

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

Orientado por
Maria Filomena Barreiro
Isabel C.F.R. Ferreira

**Bragança
2014**

Agradecimentos

Ao longo deste percurso várias foram as pessoas, que diretamente ou indiretamente me ajudaram a concluir este trabalho merecendo um sincero agradecimento.

Às minhas orientadoras **Professora Doutora Maria Filomena Barreiro** e **Professora Doutora Isabel C.F.R. Ferreira** por terem orientado o meu trabalho, pela dedicação e disponibilidade, pela exigência, pelas críticas sempre construtivas e pelas longas horas de revisão do trabalho. Agradeço ainda a confiança depositada, e todo o conhecimento transmitido tanto a nível científico como pessoal.

À **Doutora Lillian Barros** pela simpatia e carinho com que sempre me recebeu, pela ajuda e apoio nos ensaios de avaliação da atividade antioxidante.

Ao **Doutor Ricardo Calhella** pela amabilidade e amizade com que me acolheu, por toda a ajuda prestada ao longo dos ensaios de avaliação da atividade antitumoral.

A toda a equipa do **BioChemCore** pelos bons momentos proporcionados, e toda a boa disposição.

Ao **LSRE (Laboratório de Processos de Separação e Reação)** que me facultou as amostras.

Aos meus pais (**Lourenço Lameiras e Aurora Valiño**) sem os quais não teria sido possível concluir esta etapa da minha vida. Pelo apoio incondicional que sempre me deram, pelo amor, carinho e amizade. Por terem sempre acreditado em mim e pela força que me transmitiram. Por todo o esforço que fizeram ao longo destes anos. Os pais são os amigos para a vida, que nos acolhem nos bons e maus momentos, e que sem pedir nos dão um abraço quando se precisa.

À minha irmã (**Rubi Gamallo**) que pode ser a única irmã, mas sem dúvida é a melhor irmã que poderia ter tido. Obrigada pela paciência e por tudo.

Aos meus **avós maternos** que sentiram a minha ausência ao longo desta etapa e não deixaram de me apoiar e dar-me amor mesmo estando longe.

À minha **avó paterna** dirijo um grande obrigada por ter olhado por mim desde a sua partida.

Aos meus **familiares** que me apoiaram e me ajudaram.

À minha grande amiga **Filipa Sobral** que esteve sempre presente, nos melhores e piores momentos. Que me animou, que me alegrou e que festejou comigo as várias etapas desta vida.

Às minhas grandes amigas **Tânia Sacramento** e **Gisela Fernandes** que se tornaram importantes e me apoiaram, com elas partilhei alegrias e tristezas.

Aos amigos da **RaussTuna - Tuna Mista de Bragança** pelos ótimos momentos, pela alegria contagiante, pelo apoio, pela família.

Aos **amigos do mestrado (Custódio Lobo Roriz, Cynthia Malhadas, MéliSSa Lopes)** por tudo, pelos momentos vividos em Salamanca durante a nossa estadia, pela amizade.

Aos muitos **amigos de Bragança e Fafe** que me acompanharam, que me apoiaram, que fizeram e fazem parte da minha vida.

Obrigada!

Índice

Agradecimentos.....	I
Índice.....	III
Índice das figuras	V
Índice das tabelas	VI
Índice dos gráficos.....	VII
Abreviaturas.....	VIII
Resumo.....	XII
Abstract.....	XIII
I. Introdução.....	1
1.1. Lenhina	1
1.1.1. Origem	2
1.1.2 Estrutura química.....	5
1.1.3 Aplicações	6
1.2. Ensaio <i>in vitro</i> de avaliação da atividade antioxidante	8
1.2.1. Atividade captadora de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)....	8
1.2.2. Poder redutor pelo ensaio do ferricianeto/azul da Prússia	9
1.2.3 Inibição da peroxidação lipídica pelo ensaio β -caroteno/linoleato.....	10
1.3. Ensaio <i>in vitro</i> de avaliação do potencial antitumoral	11
1.3.1. Tipos de culturas	12
1.3.2. Fatores de propagação.....	13
1.3.3. Avaliação.....	14
1.3.4. Linhas celulares.....	15
1.4. Objetivos do trabalho.....	16
II. Revisão bibliográfica sobre a bioatividade da lenhina	18
2.1. Atividade antioxidante.....	18
2.1.1. Conceitos gerais	18

2.1.2. Atividade antioxidante da lenhina	21
2.2. Atividade antitumoral	23
2.2.1. Conceitos gerais	23
2.2.2. Atividade antitumoral da lenhina.....	25
III. Materiais e métodos	44
3.1. Lenhinas em estudo.....	44
3.2. Métodos para a avaliação da bioatividade	45
3.2.1. Padrões e reagentes.....	45
3.2.2. Preparação das amostras	45
3.2.3. Avaliação da atividade antioxidante	46
3.2.3.1. Atividade captadora de radicais DPPH.....	46
3.2.3.2. Poder redutor pelo ensaio do ferricianeto/azul da Prússia.....	46
3.2.3.3. Inibição da peroxidação lipídica pelo ensaio β -caroteno/linoleato.....	47
3.2.4. Avaliação do potencial antitumoral	47
3.2.5. Avaliação da hepatotoxicidade em células não tumorais	49
3.3. Análise estatística	49
IV. Resultados e discussão.....	51
V. Conclusão.....	59
VI. Bibliografia.....	60

Índice das figuras

Figura 1 – Precursores primários da lenhina (álcoois p-coumarílico, coniferílico e sinapílico).....	3
Figura 2 - Álcoois precursores das unidades de fenilpropano (p-hidroxifenilo, guaiacilo e seringilo).....	3
Figura 3 - Estrutura química proposta por Adler em 1977 (Adler, 1977).	6
Figura 4 - Esquema representativo da redução do DPPH.....	9
Figura 5 - Reações químicas envolvidas no ensaio do ferricianeto/azul da Prússia...	10
Figura 6 - Estrutura química do β -caroteno (Machado, 2011).	11
Figura 7 - Reação da descoloração do β -caroteno.	11
Figura 8 - Imagem microscópica da linha celular HeLa.....	15
Figura 9 - Imagem microscópica da linha celular HCT-15.	15
Figura 10 - Imagem microscópica da linha celular MCF-7.....	15
Figura 11 - Imagem microscópica da linha celular HepG2.	15
Figura 12 - Imagem microscópica da linha celular NCI-H460.	16
Figura 13 - Resumo das reações que causam a produção de radicais livres.....	18
Figura 14 - Principais causas e alvos da produção de espécies reativas (Lobo et al., 2010).	19
Figura 15 - Visão geral das principais reações envolvendo ROS/RNS, e das principais defesas antioxidantes endógenas, enzimáticas e não-enzimáticas, da célula.	20

Índice das tabelas

Tabela 1 - Principais características das linhas celulares.....	15
Tabela 2 - Revisão bibliográfica relativa à atividade antioxidante de diferentes tipos de lenhinas e compostos relacionados.	27
Tabela 3 – Revisão bibliográfica relativa à atividade antitumoral de diferentes tipos de lenhinas e compostos relacionados.	42
Tabela 4 - Teor de grupos hidroxilo nas lenhinas estudadas (Adaptada de Cateto (2008).....	51
Tabela 5 - Atividade antioxidante expressa em valores de EC ₅₀ (µg/ml) das lenhinas estudadas.	52
Tabela 6 - Atividade antitumoral e citotoxicidade nas células primárias de fígado, expressa em valores de GI ₅₀ (µg/ml), das lenhinas estudadas.	53
Tabela 7 - Correlações entre a composição química das lenhinas estudadas e os valores de GI ₅₀ obtidos nos ensaios de avaliação da atividade antitumoral.	57
Tabela 8 - Correlações entre a composição química das lenhinas estudadas e os valores de EC ₅₀ obtidos nos ensaios de avaliação da atividade antioxidante.....	58

Índice dos gráficos

Gráfico 1 - Representação gráfica do teor de grupos hidroxilo nas lenhinas estudadas (Adaptada de Cateto 2008).	52
Gráfico 2 – Representação gráfica da atividade antioxidante expressa em valores de EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) das lenhinas estudadas.	53
Gráfico 3 – Representação gráfica da Atividade antitumoral e citotoxicidade nas células primárias de fígado, expressa em valores de GI_{50} ($\mu\text{g/ml}$), das lenhinas estudadas.	54

Abreviaturas

A	Absorvância
AAPH	2-2'azobis (2-aminodinopropano)
Abs	Absorvância
ABTS	2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfonato)
ACR	Atividade captadora de radicais
ANOVA	Análise de variância
BMC	Células mononucleares de sangue periférico
CAT	Enzima catalase
Células 3T3	Células do tipo fibroblastos, organismo <i>Mus musculus</i> , tecido embrião
Células HaCat	Células do tipo queratinócito, organismo <i>Homo sapiens</i> , tecido pele, não tumoral
Células HeLa S3	Células do tipo adenocarcinoma, organismo <i>Homo sapiens</i> , tecido cervical
CTE	Cadeia transportadora de elétrons
DHP-FA	Polímero de desidrogenação do ácido ferúlico
DHP-pCA	Polímero de desidrogenação do ácido p-cumárico
DMEM	Meio de cultura para células animais (<i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i>)
DMSO	Dimetil sulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo
DSG	Análise colorimétrica de varrimento diferencial
e.g.	Por exemplo (<i>Exempli grata</i>)
EC ₅₀	Concentração de amostra correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor
Ensaio MN	Teste de micronúcleo da medula óssea
Ensaio MTT	3-(4,5-dimetiltiazolio-2-il-2-5-difenil)
Ensaio NRU	Ensaio de incorporação de vermelho neutro

FBS	Soro fetal de bovino
FRAP	Ensaio antioxidante pelo método dos íons de ferro
FTIR	Espectroscopia de infravermelhos
G	Guaiacilo
g/l	Relação grama/litro
g/mol	Relação grama/mol
G/S/H	Guaiacilo/siringilo/ ρ -hidroxifenilo
GI ₅₀	Concentração de amostra responsável por 50% de inibição do crescimento celular
GPx	Glutationa peroxidase
Gred	Enzima glutaniona redutase
GS	Guaiacilo-siringilo
GS-SG	Dissulfeto de glutaciona
GSH	Glutationa
GSNO	S-nitrosoglutationa
GST	Enzima glutatina-S-transferase
h	Horas
H	ρ -hidroxifenilo
HBSS	Solução salina de Hank's
HCT-15	Linha celular de carcinoma do cólon
HeLa	Linha celular de carcinoma cervical
HepG2	Linha celular de carcinoma hepatocelular
HGS	ρ -hidroxifenilo-guaiacilo-siringilo
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
hm ³	Hectômetro cúbico
HPS-CUPRAC	Ensaio de cobre reduzindo a capacidade antioxidante
IC ₅₀	Capacidade que o composto possui para inibir o crescimento de 50% das células
L [•]	Radical lipídico
Leucemia HL60	Células do tipo promielocítico, organismo <i>Homo sapiens</i> , tecido sangue periférico
LH	Lípido membranar
Linha celular Caco-2	Células do tipo epitelial, organismo <i>Homo sapiens</i> , tecido

	cólon
LO [•]	Radical lipídico alcóxilo
LOH	Álcool lipídico
LOO [•]	Radical peróxido lipídico
LOOH	Hidroperóxido lipídico
m/v	Relação massa/volume
MCF-7	Linha celular de carcinoma da mama
mg	Miligramas
mg/ml	Relação miligrama/mililitro
min	Minuto
ml	Mililitro
MNNG	N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina
mol/l	Relação mol/litro
NADP ⁺	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NADPH oxidase	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidase
NCI H-460	Linha celular de carcinoma do pulmão
nm	Nanómetro
NO [•]	Oxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
°C	Graus Celsius
OD	Densidade ótica
PLP2	Cultura primária de células de fígado de porco (<i>Porcine liver primary cell culture</i>)
POV	Índice de peróxido
PVC	Policloreto de vinilo
R [•]	Radical
R	Não radical
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
RNS	Espécie reativa de azoto
ROO [•]	Radical peróxido
ROS	Espécie reativa de oxigénio

rpm	Rotações por minuto
RPMI-1640	Meio de cultura para células animais desenvolvido pelo Instituto Roswell Park Memorial
RS	Radical superóxido
RSS	Espécie reativa de enxofre
S	Siringilo
SOD	Enzima superóxido dismutase
SRB	Sulforodamina B
T ₀	Tempo inicial
TBARS	Substâncias reativas do ácido tiobarbiturico
TCA	Ácido tricloroacético
TGA	Análise termogravimétrica
TNF	Fator alfa de necrose tumoral
Tripsina-EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
Tris	2-Amino-2- (hidroximetil) propano-1,3-diol
Trolox	Ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico
Unidades/mg	Relação unidades/miligrama
UV	Ultravioleta
v/v	Relação volume/volume
Vit. C	Vitamina C
Vit. C [•]	Radical da vitamina C
Vit. E [•]	Radical da vitamina E
Vit. E	Vitamina E
µg	Microgramas
µg/mg	Relação micrograma/miligrama
µg/ml	Relação microgramas/mililitros

Resumo

Ao longo dos últimos anos tem-se observado um interesse crescente pelo estudo de compostos naturais devido ao seu elevado potencial do ponto de vista medicinal. A seguir à celulose, a lenhina é o composto mais abundante na biosfera. É biosintetizada através do processo de lenhificação, iniciado pelos álcoois *p*-coumarílico, coniferílico e sinapílico, que originam unidades de fenilpropano (*p*-hidroxifenilo, guaiacilo e siringilo).

Neste trabalho, avaliou-se o potencial antioxidante e antitumoral de quatro lenhinas técnicas de origens diferentes (Indulin-AT, Curan-27-11P, Sarkanda e Alcell). As propriedades antioxidantes foram determinadas por ensaios *in vitro* (atividade captadora de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica). O potencial citotóxico foi avaliado em linhas celulares tumorais humanas nomeadamente, MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma pulmão), HCT-15 (carcinoma de cólon), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular); e em culturas primárias de células de fígado de porco (PLP2) pelo método da sulforrodamina B (SRB).

Todas as amostras mostraram possuir propriedades bioativas, com maior destaque para a Alcell que demonstrou ter maior potencial antioxidante e antitumoral. Os resultados obtidos foram correlacionados com características estruturais e químicas das lenhinas estudadas. Com base nos dados obtidos pode concluir-se que as lenhinas ricas em unidades fenólicas de siringilo e pobres em *p*-hidroxifenilo demonstraram maior atividade antitumoral *in vitro*.

Abstract

Over the past few years there has been a great interest in studying natural compounds due to their potentially high medicinal properties. Lignin is, after cellulose, the most abundant biopolymer on earth. It is obtained through the lignification process, initiated by *p*-coumaryl, coniferyl and sinapyl alcohols, which originate phenylpropane units (*p*-hydroxyphenyl, guaiacyl and syringyl).

In the present work, the antioxidant and antitumor potential of four technical lignins from different origins (Indulin-AT, Curan-27-11P, Sarkanda and Alcell) were evaluated. Antioxidant properties were determined by *in vitro* assays (free radicals scavenging activity, reducing power and lipid peroxidation inhibition). The cytotoxic potential was evaluated, by sulforhodamine B assay, in different human tumor cell lines (MCF-7- breast carcinoma, NCI-H460- lung carcinoma, HCT-15- colon carcinoma, HeLa- cervical carcinoma and HepG2- hepatocellular carcinoma) and in non-tumor primary culture of porcine liver cells (PLP2).

All the samples displayed bioactive properties, showing Alcell the highest antioxidant and antitumor potential. The obtained results were correlated with the chemical and structural features of the studied lignins. Based on the achieved results, it can be concluded that lignins rich in syringyl phenol units and poor in *p*-hydroxyphenyl ones gave higher *in vitro* antitumor activity.

I. Introdução

1.1. Lenhina

A descoberta da lenhina ocorreu em 1838, por Anselme Payen. No entanto, o composto descoberto foi denominado como lenhina apenas em 1866 por Schulze (Ghaffar & Fan, 2014).

Consiste numa das substâncias aromáticas mais abundantes na biosfera, encontrando-se em segundo lugar nos recursos naturais renováveis, sendo o primeiro lugar ocupado pela celulose. A sua produção anual está estimada entre $5-36 \times 10^8$ toneladas (Silva *et al.*, 2009; Hage *et al.*, 2010; Cotana *et al.*, 2014; Santos *et al.*, 2014; Verma & Dwivedi, 2014).

A lenhina encontra-se na lâmina secundária das paredes celulares sendo de difícil degradação. Tem como função não só o transporte de água, mas também é responsável pela cicatrização, pelo processo de lenhificação das células, pelo apoio estrutural e por cimentar as fibras de celulose (Sarkanen & Ludwig, 1971; Ralph, 2010; Verma & Dwivedi, 2014). Assim, contribui para a rigidez da parede celular e confere proteção química contra herbívoros, insetos e fungos, atuando como uma barreira física para retardar a degradação da hemicelulose e celulose das plantas (Cateto *et al.*, 2008, Remédios, 2010). Esta macromolécula constitui cerca de 15 a 40% do peso da matéria seca em plantas lenhosas (Doherty *et al.*, 2011).

A lenhina surge como um produto secundário do processo de obtenção do bioetanol e da indústria da pasta de papel. Durante a produção de bioetanol e de pasta de papel, a lenhina é removida sendo este processo denominado por deslinhificação (Sahoo *et al.*, 2011). As técnicas de deslinhificação consistem na cisão das ligações covalentes e grupos hidrofílicos da lenhina resultando na solubilização dos fragmentos de massa molecular inferior, sendo que a estrutura química obtida depende das condições experimentais de deslinhificação (Pouteau *et al.*, 2003).

Há duas categorias principais de lenhina, aquelas que contêm enxofre e as que são livres de enxofre. As que contêm enxofre são as que até agora têm sido mais comercializadas; estas incluem lignosulfonatos (produção mundial anual de 500.000 toneladas) e lenhina Kraft (com menos de 100 mil toneladas ao ano). As lenhinas não

modificadas são aquelas que na sua constituição não possuem enxofre, fósforo e azoto (International Lignin Institute – ILI, Remédios, 2010).

A lenhina possui um elevado grau de estabilidade química, sendo constituída por anéis aromáticos com cadeias laterais. As diferenças na composição das lenhinas devem-se à quantidade de grupos metoxilo; 21% na lenhina proveniente de árvores de folhas caducas, 16% em abeto e 14% em gramíneas (Schlegel, 1993; Chowdhury, 2014). Desempenham um papel importante ao nível do ciclo do carbono, uma vez que a atividade fotossintética das plantas é aplicada à conversão do dióxido de carbono atmosférico em lenhina. Assim sendo, as lenhinas representam cerca de 40% da energia solar armazenada nas plantas, realizando varias funções essenciais à vida destas (Remédios, 2010).

A nível industrial, cerca de 40 a 50 milhões de toneladas são produzidas anualmente a partir da indústria da celulose e indústria de papel. Estabelece-se como objetivo até 2030 a redução da utilização de combustível fóssil, por substituição por biocombustível, para aproximadamente 30%. No processo de produção de bioetanol estima-se que cerca de 227 hm³ vão gerar aproximadamente 225 milhões de toneladas de lenhina. Deste modo, pode afirmar-se que o desenvolvimento da produção de lenhinas está associado ao benefício para reduzir o impacto das atividades humanas sobre as emissões de gases do efeito de estufa, assim como de extrema importância no desenvolvimento da economia (Sahoo *et al.*, 2011; Cotana *et al.*, 2014).

1.1.1. Origem

A lenhina surge por um processo designado de lenhificação, ou seja, uma polimerização desidrogenativa, iniciada por uma enzima, de três precursores, os álcoois *p*-coumarílico, coniferílico e sinapílico; estes precursores são também designados de monolignóis (**Figura 1**). Estes originam unidades de fenilpropano do tipo *p*-hidroxifenilo, guaiacilo e seringilo quando incorporados em macromoléculas de lenhina (**Figura 2**) (Sarkanen & Ludwig, 1971; Chowdhury, 2014, Kim *et al.*, 2014).

A biossíntese dos monolignóis ocorre no citoplasma, envolvendo uma série de enzimas para a sua formação. Em suma, verifica-se a atuação de várias enzimas, iniciando-se com a desaminação da fenilalanina, derivada da via do chiquimato.

Várias reações ocorrem durante este processo nomeadamente, a redução da cadeia lateral, hidroxilação/metoxilação do anel aromático e conversão da cadeia carboxilada num grupo álcool (Verma & Dwivedi, 2014).

A polimerização das unidades básicas de fenilpropano é iniciada por oxirredutases, como a peroxidase ou lacase, que provoca uma reação de oxidação dos grupos radicais terminais fenólicos que podem sofrer acoplamento. A lacase é uma oxidase que catalisa a oxidação de vários compostos aromáticos (*e.g.*, anilinas e fenóis) reduzindo o oxigénio molecular a água. Esta está envolvida na síntese e degradação das lenhinas (Gouveia *et al.*, 2012).

A desidrogenação enzimática ocorre num grupo fenólico OH dos precursores fenilpropano, formando-se um radical por perda de um átomo de hidrogénio originando uma estrutura ressonante com formas mesoméricas. A combinação de dois radicais origina um dímero, podendo estes ainda sofrer uma nova desidrogenação enzimática, que vai dar origem a novas combinações denominadas de tetrâmeros (quando combinados com dímeros) ou trímeros (quando combinados com monómeros). O sucessivo processo de desidrogenação enzimático e acoplamento são responsáveis pelo desenvolvimento das lenhinas e da sua estrutura complexa (Alves, 2010).

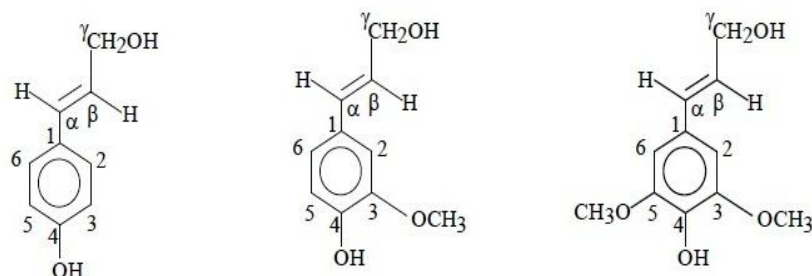


Figura 1 – Precursores primários da lenhina (álcoois *p*-coumarílico, coniferílico e sinapílico).

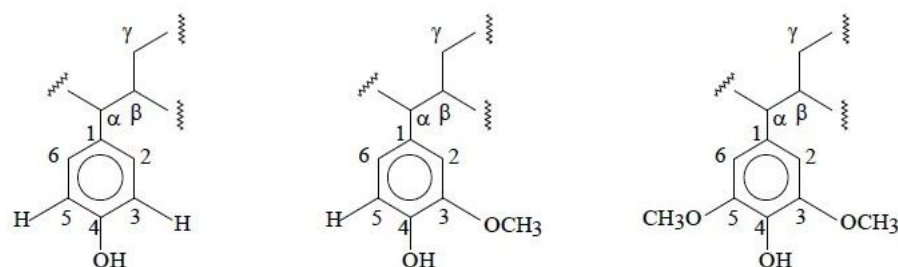


Figura 2 - Álcoois precursores das unidades de fenilpropano (*p*-hidroxifenilo, guaiacilo e siringilo).

O primeiro processo de produção de pasta de papel consistiu no processo soda que foi patenteado em 1845. Este processo ocorre num reator que envolve o aquecimento a uma temperatura que varia entre os 140 a 170 °C, com presença de 13-16% em massa de hidróxido de sódio (Doherty *et al.*, 2011).

O processo tradicional de sulfito gera um derivado solúvel em água designado por lignosulfonatos que apresenta associações com resíduos de hidratos de carbono. O ácido sulfónico presente na estrutura da lenhina promove a sua hidrofília quando origina iões Na^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , NH_4^+ , etc. A formação da pasta de papel por este processo ocorre a uma temperatura que varia entre 140 e 160°C e um pH entre 1,5 e 2 (Doherty *et al.*, 2011).

Um outro processo, o processo de Kraft, é atualmente o mais utilizado na produção de pasta de papel, gera o maior volume de lenhina. Utiliza uma solução aquosa de hidróxido de sódio e sulfureto de sódio em condições alcalinas fortes com a finalidade de dissolver a lenhina que se encontra ligada à celulose. As lenhinas são recuperadas a partir do líquido alcalino que se forma durante o processo, designado por licor negro, mediante uma diminuição do pH para valores situados entre 5 e 7,5. Este tipo de lenhinas designadas por lenhinas Kraft, são hidrofóbicas (Doherty *et al.*, 2011).

Por outro lado, o processo Organosolv, degrada a estrutura química da lenhina nativa mediante utilização de misturas álcool-água, gerando fragmentos de lenhina purificada. A lenhina Alcell é um exemplo deste tipo de lenhinas (obtida pelo processo Alcell desenvolvido pela Repap). Em contraste com a lenhina Kraft e sulfito, esta contém fragmentos fenólicos com maior hidrofobicidade. A hidrofobicidade da lenhina impede a penetração de enzimas, que resulta na hidrólise dos polissacáridos estruturais (Remédios, 2010).

O conhecimento das propriedades das lenhinas tais como a reatividade, estabilidade térmica e as propriedades macromoleculares, é essencial para a sua valorização, para além da sua utilização como combustível na indústria da produção de pasta de papel (Lin, 1992). As propriedades das lenhinas diferem de planta para planta, dependendo de condições tais como a idade, ambiente e solo. Durante os processos industriais, como por exemplo, o tratamento sulfito na indústria de papel, as lenhinas sofrem alteração das suas propriedades. Os processos de obtenção e pós-tratamento diferenciam também as propriedades das lenhinas (Sahoo *et al.*, 2011). As lenhinas provenientes da indústria de papel são designadas por lenhinas técnicas.

As lenhinas técnicas podem ser divididas em duas categorias: lenhinas comerciais, que contêm enxofre na sua composição, nas quais se incluem as lenhinas Kraft e os lignosulfonatos; e as lenhinas que não contêm enxofre, provenientes de processos Organosolv ou de processos de sacarificação/fermentação da biomassa (processos para a obtenção de bioetanol). A caracterização das lenhinas assume um papel cada vez mais importante no conhecimento da sua estrutura, motivada pelo aparecimento de novos tipos de lenhinas técnicas derivadas dos novos processos de produção de celulose ou bioetanol. Finalmente, a lenhina está também a ser muito investigada por vários cientistas tendo em vista novas aplicações práticas para esta molécula (Mansouri & Salvadó, 2004).

1.1.2 Estrutura química

As lenhinas, a nível químico, têm uma estrutura complexa e pouco uniforme. A estrutura da lenhina nativa não é conhecida mas tem sido propostos vários modelos. Um exemplo destes modelos é o proposto em 1977 por Adler (**Figura 3**).

As lenhinas são consideradas polímeros naturais heterogêneos, com caráter aromático, que possuem uma estrutura tridimensional. Derivam de uma polimerização desidrogenativa iniciada enzimaticamente a partir de três precursores (álcoois coumarílico, coniferílico e sinapílico), que, quando incorporados na estrutura macromolecular da lenhina originam unidades de fenilpropano (*p*-hidroxifenilo, guaiacilo e seringilo). Estas unidades de fenilpropano (C9 ou C6-C3) estão ligadas entre si de forma covalente, por ligações éter (β -0-4, α -0-4, 4-0-5) e carbono-carbono (β - β , 5-5', β -5). O tipo de unidades monoméricas e a sua abundância relativa dependem da origem botânica da lenhina. Em termos de grupos funcionais, a estrutura da lenhina inclui grupos hidroxilo, metoxilo, carbonilo e carboxilo em diferentes quantidades (Sarkanen & Ludwig, 1971; Cruz *et al.*, 1997; Mansouri & Salvadó, 2004; Lora, 2008).

As ligações que unem as unidades de fenilpropano são extremamente resistentes ao ataque enzimático.

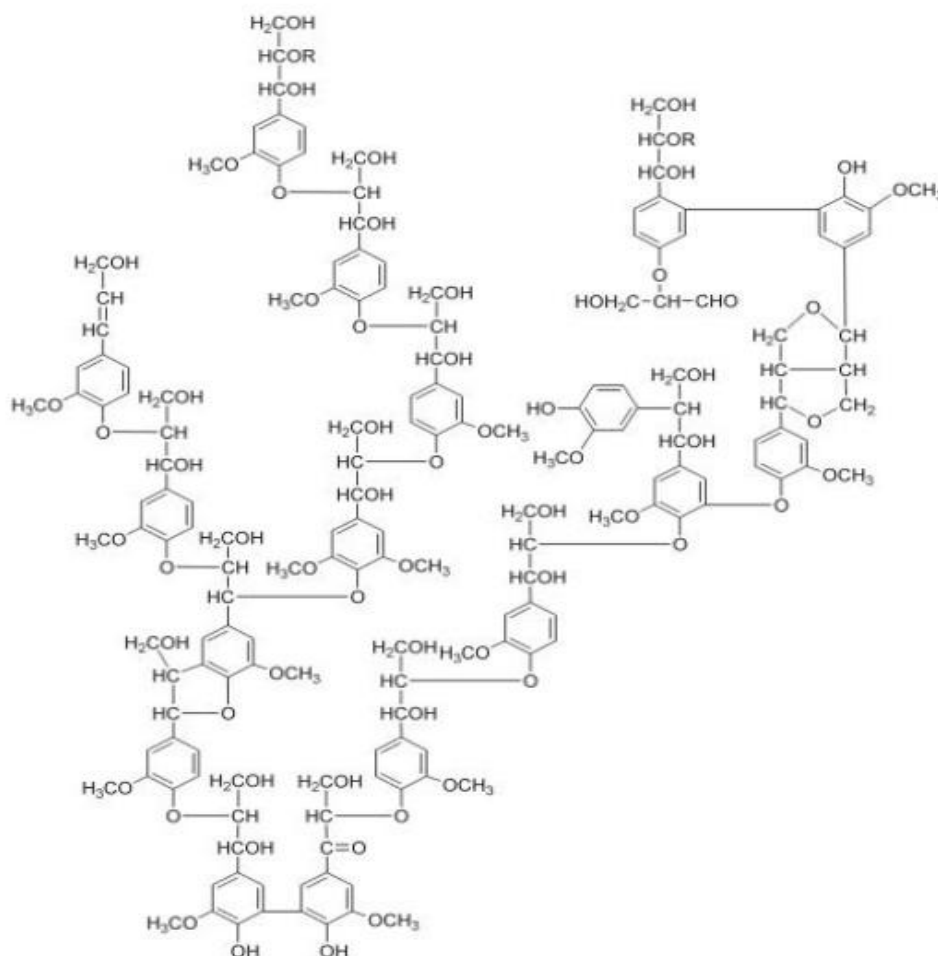


Figura 3 - Estrutura química proposta por Adler em 1977 (Adler, 1977).

Dependendo da sua origem e estágio de desenvolvimento da planta, as lenhinas apresentam diferentes composições; em plantas resinosas a estrutura dominante é do tipo guaiacilo. As lenhinas provenientes de madeiras folhosas possuem uma mistura de guaiacilo e seringilo, apresentando-se o último em maior quantidade. As gramíneas possuem lenhinas com uma estrutura maioritariamente formada por unidades do tipo *p*-hidroxifenilo (Doherty *et al.*, 2011; Verma & Dwivedi, 2014).

1.1.3 Aplicações

A indústria começou a utilizar as lenhinas na década de 1880, quando as lenhinas do tipo lignosulfonato foram usadas para curtir o couro e em processos de

tingimento. Em 1998, apenas 1% da lenhina produzida teve aplicações de elevado valor acrescentado, tendo sido iniciados alguns estudos relativos à sua biossíntese. No entanto, durante a última década diversos estudos têm sido dedicados ao desenvolvimento de materiais incorporando lenhinas. Estas têm sido também aplicadas como emulsionantes em rações de animais, uma vez que estas estão presentes nos cereais e como matéria-prima na produção de vanilina (aroma de baunilha sintética). Devido às suas propriedades antioxidantes, a sua utilização em cosméticos também tem sido estudada (Pouteau *et al.*, 2003; Vinardell *et al.*, 2008).

As lenhinas possuem diferentes grupos funcionais e propriedades que dependem de vários fatores, como descrito anteriormente. Estas diferenças são importantes no uso destas como substituto do fenol na síntese de resinas fenol-formaldeído, como co-monomero na síntese de poliuretanos e carga nas resinas de PVC (Policloreto de vinilo). Estudos realizados por Sahoo *et al.* (2011), confirmaram que as lenhinas com baixo teor de enxofre são melhores opções de carga para materiais poliméricos, reduzindo o impacto ambiental. A presença de grupos polares sugere uma melhor compatibilidade como polímeros polares, como os poliésteres. Para viabilizar a sua utilização em polímeros não polares, é necessário proceder a modificações de superfície ou utilizar compatibilizadores (Sahoo *et al.*, 2011).

A primeira aplicação medicinal conhecida das lenhinas foi a utilização de lenhinas hidrolíticas para o tratamento de problemas agudos do estômago e do intestino (Cruz *et al.*, 1997). A lenhina sendo insolúvel em água, acelera a passagem dos alimentos através do trato digestivo e aumenta o volume fecal; por isso foi também usada para o combate de hemorroidas e prisão de ventre (Remédios, 2010).

As lenhinas possuem atividade antitumoral, antiviral, atividade imunopotenciadora, antibacteriana, e ação antiparasitária (Ugartondo *et al.*, 2008). Os extratos alcalinos do material lenhocelulósico, obtidos de *Pinus parviflora* Sieb et Zucc têm também poder antimicrobiano (Cruz *et al.*, 1997).

Variando a razão polissacárido/polímero de base fenilpropano, produzem-se efeitos na heterogeneidade da acidez, solubilidade em água, insolubilidade em etanol e massa molecular do complexo lenhina-polissacárido, o que pode afetar o seu efeito antiviral (López *et al.*, 2012).

Na literatura, existem vários exemplos da utilização de derivados de lenhinas no tratamento de infeções cutâneas, de feridas supurantes de diferentes etiologias e hipercolesterolemia (Cruz *et al.*, 1997).

Atualmente sabe-se que as lenhinas inibem o crescimento do vírus do mosaico do tabaco, suprimem a proliferação do hepatoma AH414 e a sua hepatocarcinogénese e possuem um efeito protetor nas células do fígado contra as lesões que os antibióticos produzem. As frações solúveis das lenhinas apresentam atividade antiviral sobre o vírus do Herpes simplex 1 e 2, encefalites e o HIV. A sua estrutura polifenólica é responsável pela atividade antiviral (Sakagami *et al.*, 1991; Cruz *et al.*, 1997).

O complexo lenhina-polissacárido tem propriedades antitumorais, antimicrobianas e contra parasitas, e aumenta a produção do fator alfa de necrose tumoral (TNF), que é uma proteína da família das citocinas envolvidas nas atividades celulares inflamatórias. Possui efeito sinérgico com a vitamina C, o que pode ser utilizado para estimular a vitamina C para proteção de raios UV e combate ao envelhecimento (López *et al.*, 2012).

Recentemente, as lenhinas têm sido utilizadas na produção de monómeros aromáticos, com valor acrescentado, como por exemplo, a vanilina e o siringaldeído (Silva *et al.*, 2009), que atuam como antioxidantes, anti-inflamatórios, hepatoprotetores, anti-hipertensivos, coleréticos, anti-psicóticos e antiespasmódicos (Yang *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2014).

1.2. Ensaio *in vitro* de avaliação da atividade antioxidante

1.2.1. Atividade captadora de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo)

O DPPH é um radical de azoto estável, que se adquire comercialmente e apresenta uma cor púrpura intensa, e que reage com compostos que lhe possam doar um átomo de hidrogénio (*e.g.* antioxidantes da amostra a testar). Saliente-se o facto de que alguns antioxidantes poderem interferir na redução de radicais envolvidos na peroxidação lipídica como os ROO[•], e não terem qualquer efeito ou agir lentamente na captação do DPPH (Pereira, 2011; Pereira, 2011a).

No início apresenta uma cor púrpura intensa, mas em contato com o antioxidante vai apresentando uma coloração menos intensa; o DPPH é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, com uma coloração amarela, devido à adição de

uma espécie ou um radical antioxidante que se reflete numa diminuição da absorvância a 517 nm (**Figura 4**) (Pereira, 2011; Pereira, 2011a).

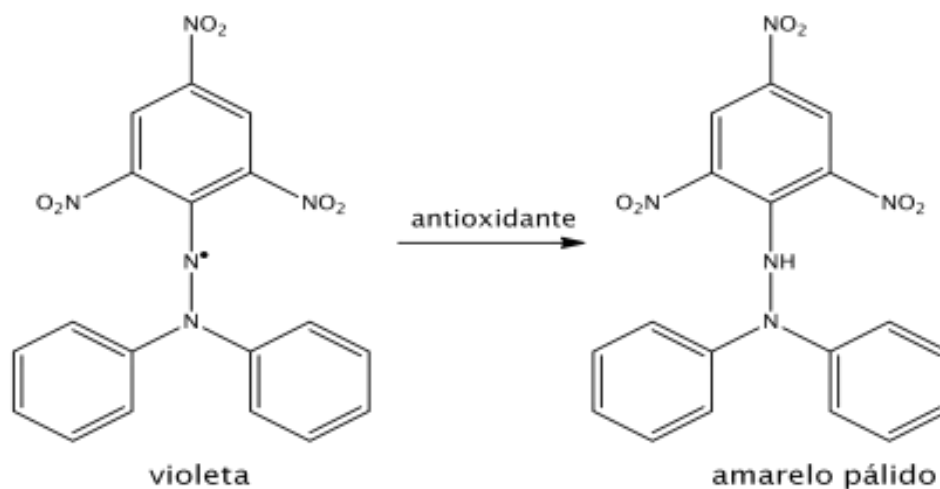


Figura 4 - Esquema representativo da redução do DPPH.

O ensaio de avaliação da atividade captadora de radicais DPPH é um método simples e rápido, mas tem as desvantagens de só se poder dissolver em meios orgânicos e dos resultados poderem ser afetados por efeitos da presença de luz, oxigénio e do tipo de solvente (Karadag *et al.*, 2009, Pereira, 2011).

1.2.2. Poder redutor pelo ensaio do ferricianeto/azul da Prússia

Trata-se de um ensaio simples, rápido, económico e bastante fiável (Prior *et al.*, 2005) que mede a capacidade dos antioxidantes reduzirem complexo Fe(III)/ferricianeto [$\text{FeCl}_3/\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$] a Fe(II), forma ferrosa (Berker, 2007, Pereira, 2011a). Conforme o poder redutor dos compostos, a cor amarela inicial da solução vai modificar-se para diferentes tons de azul da Prússia, podendo ser monitorizada por leitura da absorvância a 700 nm (**Figura 5**). A reação precisa de ocorrer em meio ácido (pH=3,6) para que a solubilidade do ferro seja mantida, diminuindo o potencial de ionização que impulsiona a transferência de eletrões e aumenta o potencial redox (Pereira, 2011).

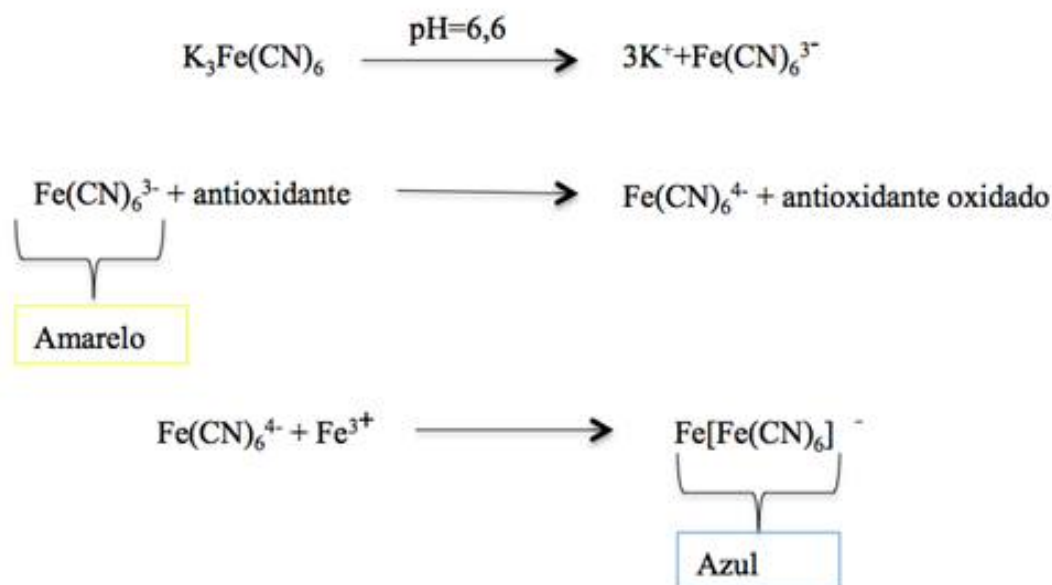


Figura 5 - Reações químicas envolvidas no ensaio do ferricianeto/azul da Prússia. O retângulo amarelo representa a cor inicial. O retângulo azul representa a cor final

1.2.3 Inibição da peroxidação lipídica pelo ensaio β -caroteno/linoleato

Os carotenoides consistem em pigmentos naturais, com mais de 600 estruturas caracterizadas, que são responsáveis pela coloração de flores, frutos, vegetais, insetos e animais marinhos, estando identificados em organismos fotossintéticos e não fotossintéticos. Exercem efeitos benéficos na prevenção de cancro, doenças cardiovasculares e osteoporose (Rao & Rao, 2007; Uenojo *et al.*, 2007; Pinto, 2010; Pinela, 2012). Consistem em tetraterpenoides de 40 carbonos unidos por unidades opostas no centro da molécula (Uenojo *et al.* 2007). Destes fazem parte os carotenos, licopeno, astaxantina, luteína e zeaxantina (El-Agamey *et al.*, 2004; Pinela, 2012).

Em particular, a molécula de β -caroteno, foi descoberta no século XX, consiste num lípido simples pertencente à classe dos terpenos e apresenta uma estrutura poli-isoprénica e um ciclo-hexeno substituído (**Figura 6**) (Uenojo *et al.*, 2007; Lehninger *et al.*, 2008; Pereira, 2011a). O β -caroteno, é um precursor da vitamina A, ou retinol; esta vitamina é um micronutriente, lipossólvel e das mais importantes, sendo produzida no fígado. A atividade antioxidante dos carotenoides verifica-se pela sua capacidade de neutralizar radicais peróxido envolvidos no

processo de peroxidação lipídica (Carocho & Ferreira, 2013). Para além das propriedades antioxidantes, melhoram a resposta imunológica (Cunha, 2005; Pinto, 2010; Pinela, 2012).

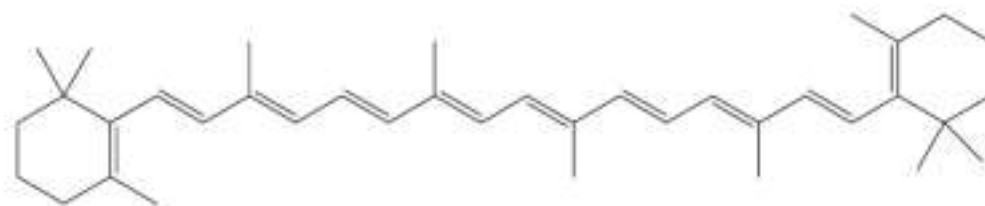


Figura 6 - Estrutura química do β -caroteno (Machado, 2011).

O ensaio da descoloração do β -caroteno fundamenta-se em medidas espectrofotométricas a uma absorvância de 470 nm, avaliando a atividade de captação de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (Pereira, 2011a). O ácido linoleico apresenta um grupo metileno bis-álíco ativo, onde o grupo metileno central é ativado por duas ligações duplas (-CH=CH-CH₂-CH=CH-) reagindo facilmente com o oxigénio, em que durante a oxidação um átomo H é removido, dando origem ao radical pentadieno que ataca o β -caroteno insaturado para recuperar átomos de H. Esta reação faz com que os carotenoides percam a sua cor laranja (Figura 7) (Burda & Oleszek, 2001; Amarowicz *et al.*, 2004; Karavalakis & Stournas, 2010).

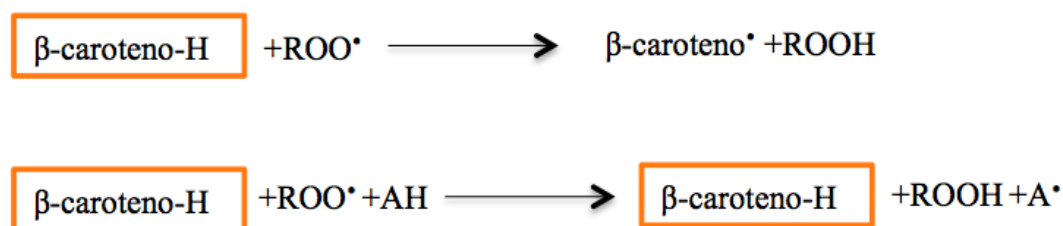


Figura 7 - Reação da descoloração do β -caroteno.

1.3. Ensaio *in vitro* de avaliação do potencial antitumoral

Ross Harrison foi biólogo e anatomista, responsável pelo primeiro passo para a cultura de células animais, cultivando neuroblastos de sapo num meio nutritivo em 1907. Mas foi no século XX, na década de 40 e 50 que as primeiras culturas de células para investigação científica foram geradas. Foi necessário vários desenvolvimentos para que fosse possível a cultura de células, nomeadamente, o

desenvolvimento de antibióticos para evitar as contaminações e a melhoria das técnicas utilizadas (Ryan, 2008).

Para os investigadores, a utilização de linhas celulares tumorais permite testar diferentes compostos sob condições altamente controladas e reprodutíveis. No entanto, este tipo de culturas não aproxima a complexidade dos tumores nos pacientes (HogenEsch & Nikitin, 2012).

1.3.1. Tipos de culturas

Existem dois tipos de culturas, as primárias e as contínuas. As primárias podem ter origem através de dois procedimentos. Aquelas que provêm diretamente do tecido animal excisado, dissociadas através de enzimas digestivas e colocadas sob a forma de células únicas em suspensão, ou pela recolha cirúrgica de pequenas peças de tecidos que são colocadas em meio de cultura. No início, estas culturas são heterogêneas, mas com o passar do tempo existe uma maior quantidade de fibroblastos. Para preparar este tipo de cultura é necessário um trabalho minucioso e que requer tempo. Uma das desvantagens é precisamente o tempo de sobrevivência curto, mas apresenta como vantagem a capacidade que têm de reter muitas características de diferenciação observáveis em células *in vivo*. O processo mais utilizado é aquele que utiliza enzimas proteolíticas (tripsina ou colagenase), em que fragmentam o tecido e rompem as ligações entre as células, criando-se uma suspensão de células únicas que é colocada num meio de cultura; este processo denomina-se dissociação enzimática (Ryan, 2008; SIGMA, 2008).

Relativamente às culturas de células do tipo contínuas, estas são compostas por um único tipo de células, propagando-se em série com um número limitado de divisões ou então ilimitadas. Quando o seu número de divisões é limitado normalmente usa células diploides. A propagação ilimitada acontece nas células que foram transformadas em células tumorais. Normalmente, estas células derivam de tumores reais ou podem também ser obtidas por indução (oncogêneses virais ou tratamentos químicos). Estas células são mais homogêneas e mais estáveis, o que faz delas mais reprodutíveis (SIGMA,2008; Hartung *et al.*, 2002).

1.3.2. Fatores de propagação

Vários fatores influenciam o bom crescimento das células. Se todas as condições forem as ideais, para além de obter uma boa cultura o número de divisões celulares (mitose) também é maior. Devem-se obter condições as mais próximas possíveis do dador.

A temperatura do meio precisa ser o mais próxima possível do dador, sendo para isso utilizado equipamentos próprios e atomizados; se for um vertebrado de sangue frio a temperatura ideal será entre 18 e 25°C, enquanto para os mamíferos será entre 36 e 37°C.

O meio de cultura é um fator importante e complexo, pois permite o acesso a nutrientes, fatores de crescimento, regulação de pH, pressão osmótica e gases essenciais. O papel dos nutrientes é possibilitar as células de produzirem proteínas e outros elementos essenciais para o crescimento e funcionamento, e produzir energia necessária para o metabolismo. Os fatores de crescimento servem para regular e controlar a taxa de crescimento celular, e as características funcionais. Normalmente, adiciona-se soro de animal entre 5 e 20% ao meio de cultura, dependendo do tipo de células.

Controlar o pH evita alterações inesperadas do meio. Normalmente, utiliza-se uma solução tampão de CO₂-bicarbonato ou uma solução tampão orgânica, permitindo que o meio mantenha um pH entre 7,0 e 7,4. Em relação à pressão osmótica, esta regula o fluxo de substâncias do interior para o exterior das células.

O meio de cultura é, normalmente, constituído por sais orgânicos, açúcares, aminoácidos, vitaminas, ácidos gordos, lípidos, proteínas, péptidos e soro. Os sais orgânicos têm a principal função de manter o equilíbrio osmótico entre as células e regular o potencial de membrana pelo fornecimento de iões cálcio, sódio e potássio.

Os açúcares permitem fornecer energia necessária para o metabolismo e os mais utilizados são a glucose e a galactose. A sua concentração varia entre 1 e 4,5 g/l.

O soro é normalmente a fonte de vitaminas, mas muitos meios são enriquecidos com vitaminas para suportar um maior número de células. As vitaminas são precursores de inúmeros co-fatores, alguns essenciais para o crescimento e proliferação celular. As vitaminas mais utilizadas são a riboflavina, tiamina e biotina.

O papel das proteínas, péptidos, ácidos gordos e lípidos é repor os que estavam presentes no ambiente normal. As proteínas e péptidos mais comuns são albumina, transferrina, fibronectina e fetuína. Os ácidos gordos e lípidos mais utilizados são o colesterol e esteroides.

O soro é uma mistura bastante complexa de albumina, fatores de crescimento e inibidores de crescimento. O mais utilizado é o soro fetal de bovino (FBS), possui diferentes funções como proteção mecânica, capacidade tampão em culturas com taxas de proliferação reduzida e ligação e neutralização de toxinas (SIGMA, 2008).

1.3.3. Avaliação

A avaliação é determinada pela morfologia, crescimento celular, eficácia da cultura e expressão de funções especiais. A contagem de células permite determinar a taxa de crescimento celular e a viabilidade das células (Ryan, 2008).

O ensaio de sulforrodamina B (SRB) é, atualmente, o método mais utilizado para a avaliação de citotoxicidade *in vitro*, e foi desenvolvido em 1990. A SRB é um corante rosa com dois grupos sulfónicos, que possui a capacidade de se ligar a componentes de proteínas das células que foram fixadas em placas de cultura, pelo ácido tricloroacético. Este ensaio está limitado pelos múltiplos passos de secagem e lavagem que não podem ser automatizados. Mas, possui como vantagem o facto de ser um método eficiente e sensível.

A determinação do IC₅₀, capacidade que o composto possui para inibir o crescimento de 50% das células, consiste na relação entre a concentração do composto e a percentagem de células mortas através da utilização das seguintes formulas, em que OD corresponde à densidade ótica (absorvância).

% de control de crescimento celular

$$= \frac{\text{Média OD amostra} - \text{media OD dia 0}}{\text{Média OD control} - \text{media OD dia 0}} \times 100$$

% *inibição do crescimento* = 100 - % *de control de crescimento celular*

1.3.4. Linhas celulares

Nos ensaios *in vitro* de avaliação do potencial antitumoral, utilizam-se várias linhas celulares (**Tabela 1**). Algumas das mais utilizadas são as HeLa (carcinoma cervical) (**Figura 8**), HCT-15 (carcinoma do cólon) (**Figura 9**), MCF-7 (carcinoma da mama) (**Figura 10**), HepG2 (carcinoma hepatocelular) (**Figura 11**) e NCI-H460 (carcinoma do pulmão) (**Figura 12**).

Tabela 1 - Principais características das linhas celulares.

Linha celular	Organismo	Tecido	Morfologia	Propriedades da cultura
NCI-H460	<i>Homo sapiens</i>	Pulmão	Epitelial	Aderente
MCF-7	<i>Homo sapiens</i>	Glândula mamária	Epitelial	Aderente
HCT-15	<i>Homo sapiens</i>	Cólon	Epitelial	Aderente
HeLa	<i>Homo sapiens</i>	Cervical	Epitelial	Aderente
HepG ₂	<i>Homo sapiens</i>	Fígado	Epitelial	Aderente

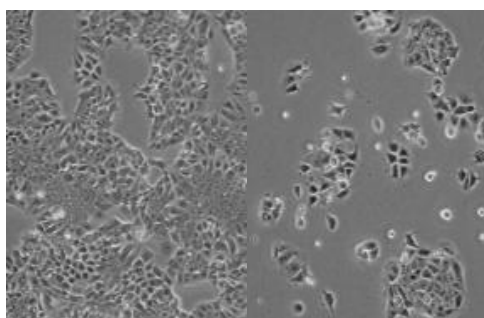


Figura 8 - Imagem microscópica da linha celular HeLa.

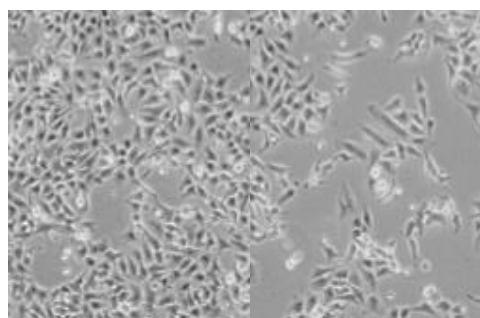


Figura 9 - Imagem microscópica da linha celular HCT-15.

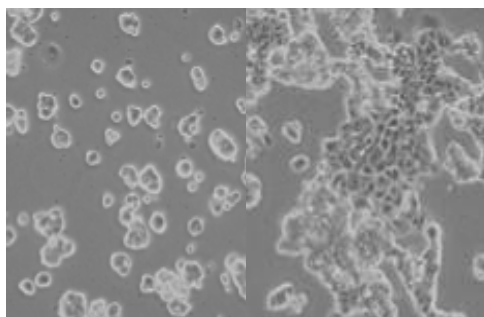


Figura 10 - Imagem microscópica da linha celular MCF-7

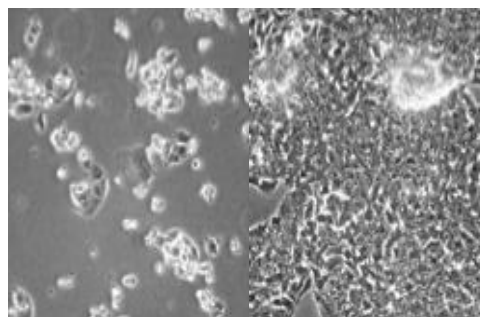


Figura 11 - Imagem microscópica da linha celular HepG2.

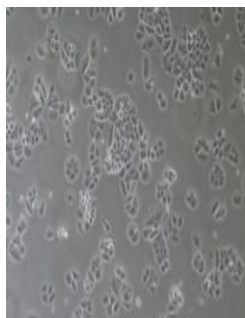


Figura 12 - Imagem microscópica da linha celular NCI-H460.

1.4. Objetivos do trabalho

Os materiais lenhocelulósicos, em particular aqueles que são obtidos como resíduos da atividade agroindustrial e florestal, constituem fontes promissoras de compostos bioativos com potencial aplicação em diferentes setores industriais. O presente trabalho incidiu sobre o estudo da bioatividade de quatro lenhinas técnicas (Alcell, Indulin-AT, Sarkanda and Curan 27-11P), isto é lenhinas obtidas como resíduo da indústria da pasta de papel. Pretende-se com este trabalho, não só apresentar alternativas para a valorização de resíduos de um setor industrial importante no contexto nacional, como também contribuir para a viabilização do conceito de biorefinaria que segue uma perspectiva de valorização integral da biomassa.

Assim, o objetivo do trabalho consiste:

- a. Realizar uma revisão bibliográfica sobre o estudo da bioatividade de lenhinas, nomeadamente atividade antioxidante e antitumoral.
- b. Avaliar potencial antioxidante por diferentes ensaios *in vitro*: atividade captadora de radicais livres (ensaio DPPH- 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), poder redutor (ensaios Ferricianeto/azul da Prússia), e inibição da peroxidação lipídica (ensaio β -caroteno/linoleato).
- c. Avaliar o potencial citotóxico em linhas celulares tumorais humanas nomeadamente, MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma pulmão), HCT-15 (carcinoma de cólon), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma

hepatocelular); e em culturas primárias de células de fígado de porco (PLP2) pelo método da sulforrodamina B (SRB).

d. Correlacionar os resultados obtidos com as características estruturais e químicas das lenhinas estudadas de acordo com o trabalho publicado por Cateto *et al.* (2008).

Para o efeito foram selecionadas 4 lenhinas técnicas de diferentes origens botânicas e provenientes de diferentes processos industriais (Indulin-AT, Curan-27-11P, Sarkanda and Alcell). O trabalho apresentado incidiu sobre a avaliação da bioatividade, sendo os resultados da caracterização química e estrutural adaptados do trabalho de Cateto (2008).

II. Revisão bibliográfica sobre a bioatividade da lenhina

2.1. Atividade antioxidante

2.1.1. Conceitos gerais

Os radicais livres podem ser átomos, moléculas ou iões que possuem eletrões desemparelhados, sendo altamente instáveis e propícios à ocorrência de reações químicas com outras moléculas. Eles derivam de três elementos: oxigénio, azoto e enxofre, fazendo parte das espécies reativas de oxigénio (ROS), azoto (RNS) e enxofre (RSS) (**Figura 13**) (Ferreira & Abreu, 2007; Ferreira, *et al.*, 2009; Carochó & Ferreira, 2013). Os radicais livres são normalmente produzidos nas mitocôndrias, através da xantina oxidase e peroxissomas. Os peroxissomas são organelos que realizam as reações de oxidação que conduzem à produção de peróxido de hidrogénio (H_2O_2). Estes contêm a catalase que degrada o H_2O_2 , decompondo-o ou convertendo-o em água (Cooper, 2000). Fatores como o exercício físico, processos de inflamação, fagocitose, tabagismo, drogas, poluentes ambientais, entre outros, ajudam também a promover a produção de radicais livres. O equilíbrio entre a produção e a neutralização de ROS por antioxidantes pode ser alterado e, uma superprodução de ROS pode originar nas células um stresse oxidativo. Os principais alvos das ROS são as proteínas, DNA, RNA, açúcares e lípidos (**Figura 14**) (Lobo *et al.* 2010; Carochó & Ferreira, 2013).

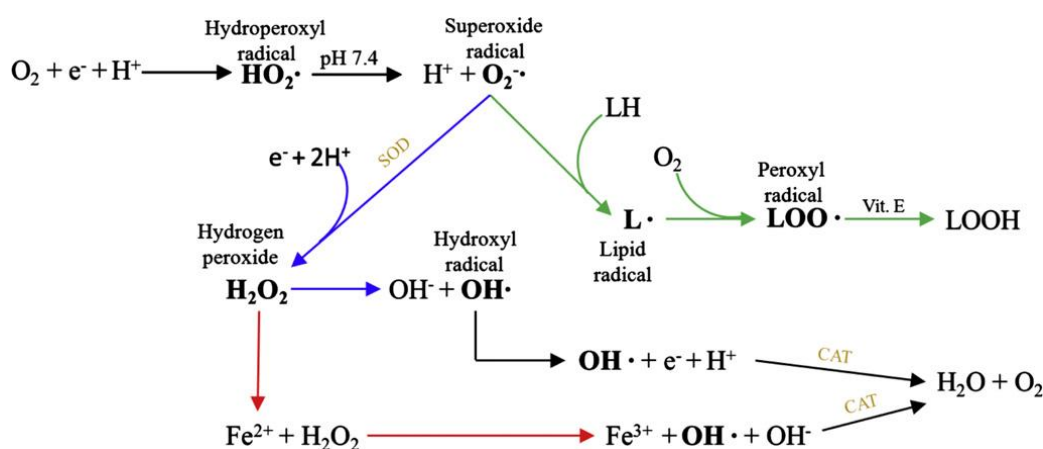


Figura 13 - Resumo das reações que causam a produção de radicais livres.

As setas verdes representam a peroxidação lipídica, as setas azuis a reação de Haber-Weiss e as setas vermelhas a reação de Fenton. As setas a negrito representam reações entre radicais ou outras espécies reativas como H_2O_2 . SOD corresponde à enzima superóxido dismutase e CAT à enzima catalase (Carochó & Ferreira, 2013).

Algumas reações que levam à produção de ROS, RNS e RSS têm vindo a ser associadas a determinadas doenças crónicas, nomeadamente cancro, doenças cardiovasculares, distúrbios neurológicos, doenças renais, doenças hepáticas, doenças autoimunes, obesidade e distúrbios degenerativos associados ao envelhecimento, Alzheimer e Parkinson (Ferreira *et al.*, 2009; Lobo *et al.*, 2010; Carocho & Ferreira, 2013).

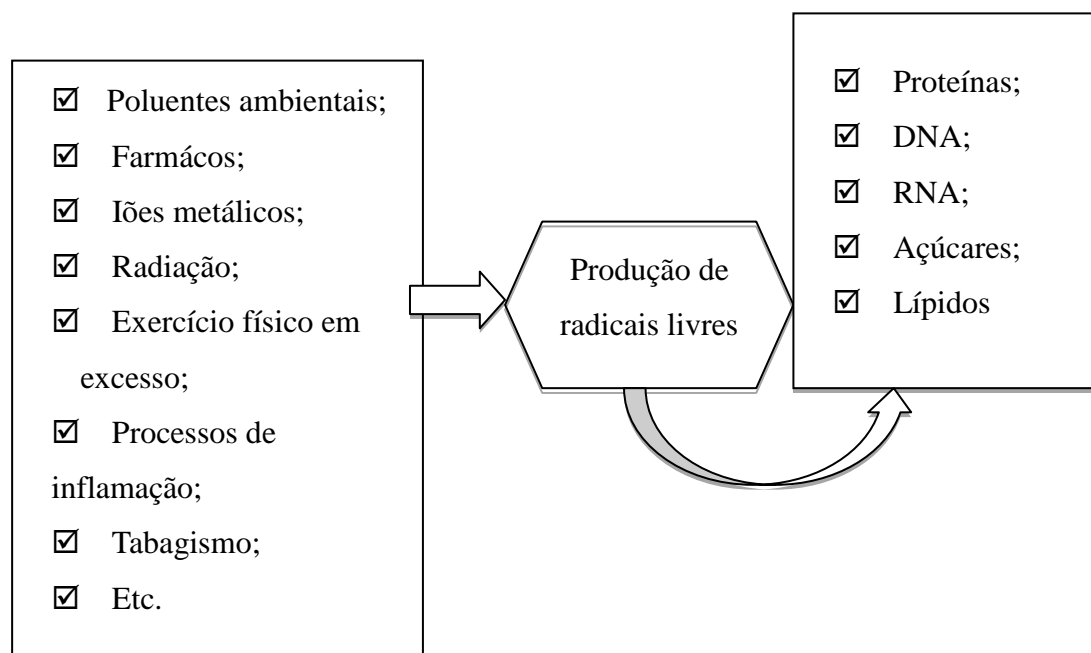


Figura 14 - Principais causas e alvos da produção de espécies reativas (Lobo *et al.*, 2010).

Os antioxidantes, quando presentes em concentrações elevadas, podem atuar como pro-oxidantes. Os pro-oxidantes são definidos como produtos químicos que induzem o stresse oxidativo, geralmente através da formação de espécies reativas ou inibindo o sistema antioxidante (Carocho & Ferreira, 2013). O stresse oxidativo consiste na desregulação da produção de espécies reativas, tornando-se esta produção mais elevada que a capacidade que o organismo tem de neutralizá-las (Ferreira & Abreu, 2007; Ferreira *et al.*, 2009). Tal situação pode acontecer quando algum tipo de antioxidante é ingerido em grandes quantidades, tornando-se assim tóxico para o organismo.

O sistema antioxidante humano está dividido em dois grandes grupos, o enzimático e o não enzimático. No que concerne ao grupo do sistema antioxidante enzimático, este é dividido em defesas enzimáticas primárias e defesas enzimáticas

radicais livres seja baixa; são os designados antioxidantes exógenos (*e.g.*, vitamina C e vitamina E). Os antioxidantes presentes na nossa dieta assumem um papel importante como protetores, ajudando o organismo na redução dos danos provocados pelas espécies reativas. Concentrações baixas de ROS podem ser benéficas para a célula, pois estas espécies estão envolvidas em vários processos fisiológicos de sinalização e regulação (Ferreira & Abreu, 2007; Ferreira *et al.*, 2009; Carocho & Ferreira, 2013). Por outro lado, os antioxidantes naturais podem também ser utilizados para a prevenção de perda de cor dos alimentos, sabor e teor de vitaminas ativas, proporcionando a estabilização das moléculas envolvidas (Faustino *et al.*, 2010). Um agente antioxidante é qualquer molécula capaz de impedir ou retardar processos de oxidação induzido por espécies oxidantes, tais como radicais livres. Muitos compostos naturais que possuem uma estrutura de polifenóis, como as lenhinas, possuem esta propriedade (García *et al.*, 2012).

Hoje em dia, os consumidores têm vindo a demonstrar uma maior preferência para os aditivos naturais; a segurança questionável dos compostos sintéticos é um dos grandes motivos para essa preferência e, por isso, tem vindo a observar-se um aumento da utilização de antioxidantes naturais como substitutos dos de síntese química (Carocho *et al.*, 2014). No entanto, isso nem sempre garante a ausência de toxicidade ou efeitos alérgicos, sendo necessária uma avaliação experimental prévia.

Segundo Dizhbite *et al.* (2004), o efeito antioxidante das lenhinas devem-se à presença de grupos fenólicos. Alguns estudos demonstraram também que as lenhinas e os seus produtos de degradação podem atuar como estabilizantes térmicos e inibidores da fotodegradação de alguns polímeros (McCarthy & Islam, 2000; Dizhbite *et al.* 2004; Vinardell *et al.*, 2008; Remédios; 2010).

2.1.2. Atividade antioxidante da lenhina

As lenhinas são polímeros fenólicos o que lhes confere propriedades antioxidantes. No entanto, possuindo em média 1-2 grupos hidroxilos por monómero (caráter polar), pode haver alguma limitação na sua reatividade com alguns radicais que são responsáveis pela oxidação (por vezes, de natureza apolar), o que pode limitar o seu efeito protetor antioxidante. Uma boa solubilidade e baixa volatilidade são

fatores importantes para a estabilização das propriedades antioxidantes (Pouteau *et al.*, 2003). Segundo Li & Ge (2012), a lenhina é eficaz na estabilização das reações induzidas pelas ROS.

A atividade antioxidante depende do número e posição dos grupos hidroxilo, da natureza das substituições nos anéis aromáticos, e da massa molecular. Lenhinas com uma elevada massa molecular possuem menor efeito antioxidante (Pan *et al.*, 2006; Dizhbite *et al.*, 2010; Toh *et al.*, 2010). Estudos realizados por Pouteau *et al.* (2003) demonstraram que uma baixa massa molecular melhora a atividade antioxidante das lenhinas e um baixo teor de OH alifáticos e OH fenólicos tendem a diminuir a compatibilidade com a matriz de polipropileno.

Devido ao seu potencial antioxidante, as lenhinas possuem um efeito protetor contra a peroxidação lipídica e oxidação do DNA (Nsimba *et al.*, 2012). Precisamente devido à sua atividade antioxidante, podem ser usadas como inibidores ou neutralizadores em processos de oxidação para estabilizar as reações induzidas por radicais de oxigénio e suas espécies derivadas (Zhou *et al.*, 2012).

De facto, os efeitos antioxidantes das lenhinas têm suscitado muito interesse (Hussin *et al.*, 2014) e são vários os estudos disponíveis na literatura que descrevem a atividade antioxidante de lenhinas de diferentes origens nomeadamente, botânica (*e.g.*, *Acacia nilotica*, *Acanthopanax senticosus*, *Acer nikoense*, *Betula alnoides*, *Ceriops decantra*, *Crataegus cuneata*, *Eucalyptus globulus*, *Miscanthus sinensis*, *Phyllostachys pubescan*, *Phyllostachys sulphera*, *Pinus parviflora*, *Populus nigra x P. maxtmowtzcii*), comercial e sintética (**Tabela 2**).

Os ensaios realizados para avaliar as suas propriedades antioxidantes incluem a determinação da atividade de captação de radicais livres (*e.g.*, AAPH- 2,2'-azobis (2-aminodinopropano, ABTS- ácido 2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazoline-6-sulfónico, DPPH- 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo ou RS- radical superóxido), atividade de enzimas antioxidantes (*e.g.*, superóxido dismutase), poder redutor (*e.g.*, HPS-CUPRAC- capacidade antioxidante redutora do ião cúprico e FRAP- ensaio antioxidante pelo método dos iões de ferro), inibição da peroxidação lipídica (TBARS- ácido tiobarbitúrico e POV - valor peróxido) e fenóis totais (ensaio de Folin-Ciocalteu).

Em particular, Sakagami *et al.* (1987, 1998, 1999) (**Tabela 2**), extraíram frações de lenhina de *Pinus parviflora*, *Crataegus cuneata*, *Acer nikoense* e *Ceriops decantra* para avaliar a atividade da superóxido dismutase; os melhores resultados

foram obtidos para a fração VII de *P. parviflora* (8 unidades/mg), fração IV de *C. cuneata* (6 unidades/mg), fração III de *A. nikoense* (0,3 unidades/mg) e fração III do *C. decantra* (3 unidades/mg). Outro exemplo é o estudo realizado por Lu *et al.* (1998) que descreveram uma forte atividade captadora de radicais superóxido ($EC_{50}=46,29 \mu\text{g/ml}$) de uma lenhina alcalina. Outra lenhina solúvel alcalina obtida a partir de madeira de caducifólia e conífera, com massa molecular de 2200 g/mol, 15,1% OCH_3 , 5,0% OH_{fen} e 3,5% OH_{alif} , apresentou atividade captadora de DPPH (0,5 mol DPPH reduzido/mol lenhina) (Dizhbite *et al.*, 2004) (**Tabela 2**).

2.2. Atividade antitumoral

2.2.1. Conceitos gerais

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (2010), o cancro é uma das principais causas de morte no mundo e deverá aumentar para mais de 11 milhões de casos em 2030. Neste momento, estima-se que a incidência seja cerca de 6 milhões de casos por ano (Rodrigues *et al.*, 2012; Ibrahim *et al.*, 2013). Na verdade, nos países desenvolvidos esta doença é a segunda principal causa de morte (Ponnala *et al.*, 2012). São várias as causas que podem provocar este tipo de patologia, entre elas a hereditariedade e a poluição, uma má alimentação, consumo de álcool, tabagismo, etc. É uma doença caracterizada por uma rápida degeneração, em que as células crescem e dividem-se de forma descontrolada.

O corpo humano é composto por diferentes células que se dividem e multiplicam de acordo com as necessidades do organismo. No entanto, um desequilíbrio entre a proliferação e a morte celular pode resultar na formação de cancro. A apoptose, morte celular programada, está envolvida na manutenção da homeostasia do tecido e proporciona um ambiente controlado de eliminação das células, de proliferação celular por meio de mecanismos bioquímicos, sendo um importante processo para eliminar as células cancerosas. A indução da apoptose é atualmente uma estratégia para combater a proliferação das células (Ibrahim *et al.*, 2013; Mohankumar *et al.*, 2014).

Os tumores são formados por uma população celular heterogénea, possuindo um elevado grau de instabilidade genética e uma variabilidade fenotípica. A interação

que existe entre as células tumorais e o ambiente hospedeiro conduz a uma ativação de fibroblastos e de células endoteliais, e ao recrutamento de células inflamatórias e do sistema imunológico (HogenEsch & Nikitin, 2012). Os neoplasmas humanos englobam diferentes tipos de células, em que as suas funções são influenciadas por distintos agentes químicos, físicos e fatores biológicos que estão presentes no microambiente. A comunicação entre estas células ocorre através de sinalização heterotípica e em conjunto com fatores sistêmicos e locais (Thoma *et al.*, 2014).

O cancro da mama é o cancro maligno mais comum do sexo feminino e a segunda causa de morte nos países desenvolvidos. Em 2008 na Europa, 128.700 mortes estiveram relacionadas com este cancro (Senkus *et al.* 2014). O cancro cervical consiste numa neoplasia maligna ginecologicamente predominante, e continua a ser uma das principais causas de morte por cancro entre as mulheres (Lo & Wang, 2013). O cancro do cólon é o terceiro cancro mais comum no mundo, tendo maior prevalência nos países ocidentais. Recentemente, a incidência deste tipo de cancro tem vindo a aumentar nos países asiáticos, devido às rápidas mudanças de padrão alimentar e às suas preferências. Segundo estudos epidemiológicos, o alto consumo de carne vermelha que se verifica nestes países está associada ao aumento de incidência deste tipo de cancro (Ponnala *et al.*, 2012; Esakkirajan *et al.*, 2014). Segundo a Organização Mundial de Saúde, em 2008 cerca de 700 000 indivíduos morreram devido ao cancro do fígado, encontrando-se em sexto lugar na lista dos cancros mais comuns, e em terceiro como causa de morte (Chen & Zhang, 2011; Bakiri & Wagner, 2013). Alguns fatores de risco como o tabagismo, hepatites B e C, consumo excessivo de álcool são responsáveis pelo aparecimento deste cancro (Conte, 2000; Block *et al.*, 2003; Sasco *et al.*, 2004). O cancro do pulmão é a primeira causa de morte em todo o mundo, quando se trata de cancro. O fumo do tabaco é a principal causa de aparecimento da doença, cerca de 95% dos casos (Marabito *et al.*, 2014). Outros fatores como a fibrose pulmonar idiopática e a pneumonia intersticial idiopática estão também associados a esta patologia (Minegishi *et al.*, 2014).

Vários estudos têm sido desenvolvidos para identificar agentes quimioterapêuticos e quimiopreventivos que possam atuar em vários alvos de sinalização. Muitos agentes quimioterapêuticos atuam através da citotoxicidade o que leva à inibição da carcinogénese. O desenvolvimento de resistência a medicamentos de quimioterapia, a resistência à indução da apoptose, e os efeitos secundários que provocam em pacientes com cancro, têm contribuído para que novas formas de

tratamento sejam desenvolvidas. Assim, há uma procura constante de novos agentes citotóxicos, que podem servir de base para o desenvolvimento de quimioterapêuticos.

A aplicação de quimioterapêuticos à base de compostos naturais tem vindo a ser uma das preferências para o combate no carcinoma do cólon. Hoje em dia, existem cerca de 120 substâncias químicas derivadas de plantas que são incluídas em fármacos como princípios ativos. Além disso, a descoberta de novos agentes citotóxicos pode proporcionar a oportunidade de obter uma compreensão mais detalhada dos mecanismos de ação envolvidos. No entanto, um problema que se apresenta na utilização destes agentes é a ocorrência de efeitos secundários indesejáveis que são produzidos pela não especificidade tumoral e múltiplas resistências aos fármacos. Portanto, torna-se essencial a descoberta de anti-cancerígenos seguros, potentes e seletivos (Ponnala *et al.*, 2012; Ibrahim *et al.* 2013; Lo & Wang, 2013; Esakkirajan *et al.*, 2014; Mohankumar *et al.*, 2014).

As plantas e seus derivados oferecem oportunidades de descobrir novos fármacos, devido à grande diversidade estrutural de compostos que contêm. Mohankumar *et al.* (2014) investigaram a comparação da curcumina com o seu análogo (BDMC-A), em que se efetuou a substituição do *orto*-hidroxi, composto presente no açafrão utilizado como ingrediente, para racionalizar a atividade antitumoral. Verificou-se que BDMC-A induz mais a apoptose do que a curcumina, devido à presença de OH na posição *orto* da estrutura (Mohankumar *et al.*, 2014). O ácido cinâmico, segundo Heleno *et al.* (2014), possui atividade citotóxica contra linhas celulares tumorais humanas, incluindo carcinoma da mama (MCF-7), carcinoma do cólon (HCT-15), carcinoma cervical (HeLa), carcinoma hepatocelular (HepG2) e carcinoma do pulmão (NCI-H460). Os compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, são outro exemplo de compostos bioativos com efeitos benéficos sobre a saúde humana, incluindo a regulação das vias de proliferação e morte celular que levam ao cancro (Rodrigues *et al.*, 2012; Guimarães *et al.*, 2013; Heleno *et al.*, 2014).

2.2.2. Atividade antitumoral da lenhina

Tanto quanto é do conhecimento do autor deste trabalho, os estudos relativos ao potencial antitumoral são mais escassos do que os estudos relacionados com a

atividade antioxidante. Os estudos existentes descrevem a utilização de diferentes ensaios (*e.g.*, clivagem do DNA internucleossomal, ensaio MN- ensaio de micronúcleos, ensaio MTT – brometo de 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difenil) tetrazólio e ensaio NRU- ensaio de incorporação de vermelho neutro) e modelos (*e.g.*, BMC- células mononucleares de sangue periférico, Caco-2- linha celular humana de adenocarcinoma coloretal epitelial heterógeno, células 3T3 - fibroblastos, células HaCat- queratinócitos, células HeLa S3 – células de adenocarcinoma, células HL 60- células de leucemia promielocítica humana, células Sarcoma 180, entre outros).

A lenhina sintética (DHP-*p*CA - polímeros de desidrogenação de ácido *p*-cumárico e DHP-FA - polímeros de desidrogenação do ácido ferúlico) parece ser a mais promissora, apresentando os menores valores de GI₅₀: 243 µg/ml e 364 µg/ml para a clivagem do DNA internucleossomal e apoptose nas células de leucemia HL-60 promielocítica humana, respetivamente (Sakagami *et al.*, 1999).

Em particular, Cruz *et al.* (1997) descreveram um efeito antitumoral de lenhinas no cólon e verificaram também que estas inibem o crescimento de sarcomas em células de ratos e o aparecimento de tumores de pele. Uma lenhina obtida a partir de resíduos de produção de papel e celulose mostrou inibir a mutagénese e mostrou um efeito protetor sobre o DNA, sugerindo que é um agente anti-mutagénico e anti-cancerígeno (Zhou *et al.*, 2012). Têm também sido descritas como inibidoras de N-metil-N'-nitro-nitrosoguanidina (MNNG), induzida pela quebra do DNA e indicadora de mutação genética *in vitro*. Esta ação pode também estar relacionada com o seu potencial antioxidante (Kosikova *et al.*, 2002; Dizhbite *et al.*, 2004; Sakagami *et al.*, 2010). Alguns estudos demonstraram que as lenhinas têm a capacidade de ativar macrófagos de ratos e induzir a proliferação de células T e de células somáticas, sugerindo um efeito imunopotenciador que pode ser importante em situações de tumores (Yamanaka *et al.*, 2013) (**Tabela 3**).

Tabela 2 - Revisão bibliográfica relativa à atividade antioxidante de diferentes tipos de lenhinas e compostos relacionados.

Samples	Origin	Molecular weight	Chemical composition	Antioxidant activity assays	Antioxidant activity results	References
Fr. VI	<i>Pinus parviflora</i> extraction with 1% NaOH; centrifugation; acidification of the supernatant to 5.0 with acetic acid; the precipitate was collected by centrifugation (Fr. VI), and the supernatant was successively precipitate with 1 vol ethanol (Fr. VII)	n.a	n.a	SOD activity	21 unit/mg	Sakagami <i>et al.</i> , 1987; Sakagami <i>et al.</i> , 1999
Fr. VII		n.a	n.a	SOD activity	8 unit/mg	
Alkali-lignin	Commercial	n.a	n.a	Xanthine oxidase activity	59.08 µg/ml	Lu <i>et al.</i> , 1998
				Superoxide anion radical scavenging activity	46.29 µg/ml	
				G6PD activity	123.6 µg/ml	
				Hydroxyl radical scavenging activity	250 µg/ml	
				Lipid peroxidation induced by vitamin C in brain tissue	72µg/ml	
				Lipid peroxidation induced by NADPH in rat- brain tissue	100µg/ml	
	n.a	n.a	SOD activity	7 unit/mg	Sakagami <i>et al.</i> , 1999	
	Commercial with low sulfate content	n.a	n.a	ORAC	3516.72 µmol TE/g sample	Dong <i>et al.</i> , 2011
Fr. I	<i>Crataegus cuneata</i> (thorn apple) extracts	n.a	n.a	SOD activity	44 unit/mg	Satoh <i>et al.</i> , 1998; Sakagami <i>et al.</i> , 1999
Fr. II	Extraction with hot water; the supernatant (Fr. I) was obtained by centrifugation; 50% ethanol (Fr. II); extraction with	n.a	n.a	SOD activity	8 unit/mg	
Fr. III		n.a	n.a	SOD activity	13 unit/mg	
Fr. IV		n.a	n.a	SOD activity	6 unit/mg	

	1%NaOH; centrifugation; acidification of the supernatant to 5.0 with acetic acid; the precipitate was collected by centrifugation (Fr. III). To the supernatant, an equal volume of ethanol was added to precipitate Fr. IV.						
Fr. I	<i>Acer nikoense</i> bark extracts	n.a	n.a	SOD activity	3 unit/mg	Satoh <i>et al.</i> , 1998a; Sakagami <i>et al.</i> , 1999	
Fr. II	Extraction with hot water (Fr. I); aliquots of Fr. I were dialized against H ₂ O to obtain Fr. II and precipitated by addition of an equal volume of ethanol to obtain Fr. III.	n.a	n.a	SOD activity	3 unit/mg		
Fr. III		n.a	n.a	SOD activity	0.3 unit/mg		
Fr. I	<i>Ceriops decantra</i> extracts	n.a	n.a	SOD activity	53 unit/mg	Sakagami <i>et al.</i> , 1998; Sakagami <i>et al.</i> , 1999	
Fr. II	Extraction with 70% ethanol to obtain Fr I; re-extraction with H ₂ O and centrifugation; to the supernatant, 6 vol. ethanol was added to precipitate Fr. II; re-extraction with 1% NaOH and centrifugation; acidification of the supernatant to 5.0 with acetic acid; the precipitate was collected by centrifugation (Fr. III) and supernatant was separated; to the supernatant, one or 5 vol. ethanol was added to stepwisely precipitate Fr. IV and Fr. V.	n.a	n.a	SOD activity	15 unit/mg		
Fr. III		n.a	n.a	SOD activity	5 unit/mg		
Fr. IV		n.a	n.a	SOD activity	12 unit/mg		
Fr. V		n.a	n.a	SOD activity	8 unit/mg		

Pine seed shell extracts	<i>Pinus parviflora</i>	n.a	n.a	SOD activity	88 unit/mg	Sakagami <i>et al.</i> , 1999
Lignin sulfonate	Commercial	n.a	n.a	SOD activity	6 unit/mg	Sakagami <i>et al.</i> , 1999
		n.a	n.a	Inhibition of human erythrocyte hemolysis induced by AAPH	133.6 µg/ml	Ugartondo <i>et al.</i> , 2008 Vinardell <i>et al.</i> , 2008
DHP-pCA	Synthetic lignin	n.a	n.a	SOD activity	5 unit/mg	Sakagami <i>et al.</i> , 1999
DHP-FA	Synthetic lignin	n.a	n.a	SOD activity	24 unit/mg	Sakagami <i>et al.</i> , 1999
Acid soluble lignin	Coniferous and deciduous wood species	1980 g/mol	21.5% OCH ₃ , 5.1% OH _{phen} , 3.3% OH _{aliph} ;	DPPH assay	1.5 mol reduced DPPH/mol lignin	Dizhbite <i>et al.</i> , 2004
Ethanol lignin	Aspen Methanol extraction	1870 g/mol	25.0% OCH ₃ , 2.0% OH _{phen} , 4.5% OH _{aliph} ;	DPPH assay	0.6 mol reduced DPPH/mol lignin	
Alkaline soluble lignin		3100 g/mol	18.1% OCH ₃ , 3.6% OH _{phen} , 5.2% OH _{aliph} ;	DPPH assay	1.1 mol reduced DPPH/mol lignin	
Alkaline soluble lignin	Coniferous and deciduous wood species	2200 g/mol	15.1% OCH ₃ , 5.0% OH _{phen} , 3.5% OH _{aliph} ;	DPPH assay	0.5 mol reduced DPPH/mol lignin	Dizhbite <i>et al.</i> , 2004
Milled wood lignin	Spruce Methanol extraction	7500 g/mol	25.0% OCH ₃ , 2.0% OH _{phen} , 4.5% OH _{aliph} ;	DPPH assay	0.6 mol reduced DPPH/mol lignin	
Alkaline soluble lignin	Coniferous and deciduous wood species	2990 g/mol	17.4% OCH ₃ , 4.0% OH _{phen} ; 6.9% OH _{aliph}	DPPH assay	1.0 mol reduced DPPH/mol lignin	Dizhbite <i>et al.</i> , 2004
	Birch Methanol extraction					
Kraft lignin (Curan 100)	Methanol soluble fraction from Kraft lignin	4317 g/mol	14.9% OCH ₃ , 4.3% OH _{phen} , 2.1% OH _{aliph} ;	DPPH assay	4.5 mol reduced DPPH/mol lignin	Dizhbite <i>et al.</i> , 2004
	Methanol extraction					
	Commercial	5545 g/mol	14.8% OCH ₃ , 4.3% OH _{phen} , 2.2% OH _{aliph}	DPPH assay Inhibition of human erythrocyte hemolysis induced by AAPH TBARS (erythrocyte suspensions 5%)	1.0 mol reduced DPPH/mol lignin 85.9 µg/ml 152 µg/ml	Ugartondo <i>et al.</i> , 2008 Vinardell <i>et al.</i> , 2008 Ugartondo <i>et al.</i> , 2009

						Pan <i>et al.</i> , 2006
	Hybrid poplar (<i>Populus nigra</i> x <i>P. maxmowiczii</i>)					
EL1	165°C, 40 min, 1.00% of wood (H ₂ SO ₄), 65 % v/v ethanol concentration;	3877 g/mol	2.21 nmol ArOH/g of lignin, 5.01 nmol AlkOH/g of lignin, 6.98 nmol MeO/g of lignin;	DPPH assay	12.5 mol reduced DPPH/mol lignin;	
EL2	195°C, 40 min, 1.00% of wood (H ₂ SO ₄), 65 % v/v ethanol concentration;	4191 g/mol	2.50 nmol ArOH/g of lignin, 4.62 nmol AlkOH/g of lignin, 7.64 nmol MeO/g of lignin;	DPPH assay	57.5 mol reduced DPPH/mol lignin;	
EL3	165°C, 80 min, 1.00% of wood (H ₂ SO ₄), 35 % v/v ethanol concentration;	1962 g/mol	3.14 nmol ArOH/g of lignin, 4.92 nmol AlkOH/g of lignin, 8.35 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay	58.2 mol reduced DPPH/mol lignin;	
EL4	195°C, 80 min, 1.00% of wood (H ₂ SO ₄), 35 % v/v ethanol concentration;	1105 g/mol	4.63 nmol ArOH/g of lignin, 3.29 nmol AlkOH/g of lignin, 8.04 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay	122.0 mol reduced DPPH/mol lignin;	
EL5	165°C, 40 min, 1.50% of wood (H ₂ SO ₄), 35 % v/v ethanol concentration;	1991 g/mol	3.38 nmol ArOH/g of lignin, 4.13 nmol AlkOH/g of lignin, 8.62 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay	59.6 mol reduced DPPH/mol lignin;	
EL6	195°C, 40 min, 1.50% of wood (H ₂ SO ₄), 35 % v/v ethanol concentration;	1195 g/mol	4.83 nmol ArOH/g of lignin, 3.15 nmol AlkOH/g of lignin, 6.58 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay	66.7 mol reduced DPPH/mol lignin;	
EL7	165°C, 80 min, 1.50% of wood (H ₂ SO ₄), 65 % v/v ethanol concentration;	3596 g/mol	2.94 nmol ArOH/g of lignin, 3.78 nmol AlkOH/g of lignin, 8.45 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay	26.3 mol reduced DPPH/mol lignin;	
EL8	195°C, 80 min, 1.50% of wood (H ₂ SO ₄), 65 % v/v ethanol concentration;	1888 g/mol	4.38 nmol ArOH/g of lignin, 2.73 nmol AlkOH/g of lignin, 8.11 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay	68.5 mol reduced DPPH/mol lignin;	
EL9	155°C, 60 min, 1.25% of wood (H ₂ SO ₄), 50 % v/v	3840 g/mol	2.31 nmol ArOH/g of lignin, 5.14 nmol	DPPH assay	26.3 mol reduced DPPH/mol lignin;	

	ethanol concentration;		AlkOH/g of lignin, 7.91 nmol MeO /g of lignin;		
EL10	205°C, 60 min, 1.25% of wood (H ₂ SO ₄), 50 % v/v ethanol concentration;	1579 g/mol	4.24 nmol ArOH/g of lignin, 3.01 nmol AlkOH/g of lignin, 7.86 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay	61.8 mol reduced DPPH/mol lignin;
EL11	180°C, 26 min, 1.25% of wood (H ₂ SO ₄), 50 % v/v ethanol concentration;	2953 g/mol	2.86 nmol ArOH/g of lignin, 4.67 nmol AlkOH/g of lignin, 8.52 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay	23.8 mol reduced DPPH/mol lignin;
EL12	180°C, 94 min, 1.25% of wood (H ₂ SO ₄), 50 % v/v ethanol concentration;	1942 g/mol	3.78 nmol ArOH/g of lignin, 3.55 nmol AlkOH/g of lignin, 8.63 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay	47.6 mol reduced DPPH/mol lignin;
EL13	180°C, 60 min, 0.83% of wood (H ₂ SO ₄), 50 % v/v ethanol concentration;	3100 g/mol	2.80 nmol ArOH/g of lignin, 4.49 nmol AlkOH/g of lignin, 7.82 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay	22.8 mol reduced DPPH/mol lignin;
EL14	180°C, 60 min, 1.67% of wood (H ₂ SO ₄), 50 % v/v ethanol concentration;	1890 g/mol	4.10 nmol ArOH/g of lignin, 3.15 nmol AlkOH/g of lignin, 8.44 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay	52.6 mol reduced DPPH/mol lignin;
EL15	180°C, 60 min, 1.25% of wood (H ₂ SO ₄), 25 % v/v ethanol concentration;	1381 g/mol	4.23 nmol ArOH/g of lignin, 3.60 nmol AlkOH/g of lignin, 8.73 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay	50.0 mol reduced DPPH/mol lignin;
EL16	180°C, 60 min, 1.25% of wood (H ₂ SO ₄), 75 % v/v ethanol concentration;	3991 g/mol	2.63 nmol ArOH/g of lignin, 4.08 nmol AlkOH/g of lignin, 8.25 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay	21.8 mol reduced DPPH/mol lignin;
EL17	180°C, 60 min, 1.25% of wood (H ₂ SO ₄), 50 % v/v ethanol concentration;	2089 g/mol	3.39 nmol ArOH/g of lignin, 3.81 nmol AlkOH/g of lignin, 8.49 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay	37.1 mol reduced DPPH/mol lignin;
EL18	180°C, 60 min, 1.25% of wood (H ₂ SO ₄), 50 % v/v	2020 g/mol	3.50 nmol ArOH/g of lignin, 3.85 nmol	DPPH assay	38.5 mol reduced DPPH/mol lignin;

	ethanol concentration;		AlkOH/g of lignin, 8.61 nmol MeO /g of lignin;			
EL19	180°C, 60 min, 1.25% of wood (H ₂ SO ₄), 50 % v/v ethanol concentration;	2065 g/mol	3.51 nmol ArOH/g of lignin, 3.83 nmol AlkOH/g of lignin, 8.63 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay		37.6 mol reduced DPPH/mol lignin;
EL20	180°C, 60 min, 1.25% of wood (H ₂ SO ₄), 50 % v/v ethanol concentration;	2105 g/mol	3.48 nmol ArOH/g of lignin, 4.00 nmol AlkOH/g of lignin, 8.77 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay		35.7 mol reduced DPPH/mol lignin;
EL21	180°C, 60 min, 1.25% of wood (H ₂ SO ₄), 50 % v/v ethanol concentration	2250 g/mol	3.50 nmol ArOH/g of lignin, 3.80 nmol AlkOH/g of lignin, 8.64 nmol MeO /g of lignin;	DPPH assay		33.8 mol reduced DPPH/mol lignin
Bagasse	Commercial	n.a	n.a	Inhibition of human erythrocyte hemolysis induced by AAPH TBARS (erythrocyte suspensions 5%)	44.9 µg/ml 148 µg/ml	Ugartondo <i>et al.</i> , 2008 Vinardell <i>et al.</i> , 2008 Ugartondo <i>et al.</i> , 2009
Steam Explosion	Commercial	n.a	n.a	Inhibition of human erythrocyte hemolysis induced by AAPH TBARS (erythrocyte suspensions 5%)	74.6 µg/ml 277 µg/ml	Ugartondo <i>et al.</i> , 2008 Vinardell <i>et al.</i> , 2008 Ugartondo <i>et al.</i> , 2009
K1	<i>Eucalyptus globulus</i> ,	n.a	n.a	DPPH assay	2.20 µg/ml	Faustino <i>et al.</i> , 2010
K2	Kraft black liquor	n.a	n.a	DPPH assay	2.48 µg/ml	
K3	Wood is delignified by	n.a	n.a	DPPH assay	2.31 µg/ml	
K4	the action of a strong	n.a	n.a	DPPH assay	3.41 µg/ml	
K5	alkaline solution	n.a	n.a	DPPH assay	2.74 µg/ml	
K2	composed mainly by sodium hydroxide and	n.a	n.a	DPPH assay	9.14 µg/ml	
K3	sodium sulphite, at a	n.a	n.a	DPPH assay	2.21 µg/ml	
K5	temperature of 160-	n.a	n.a	DPPH assay	5.89 µg/ml	
K6	170°C.	n.a	n.a	DPPH assay	2.35 µg/ml	
	K1 – K5 were obtained at different pH (pH 1, 2, 4, 6 and 12)					

	K2, K3, K5 and K6 were separated based on chloroform/ethyl acetate					
S1	<i>Eucalyptus globulus</i> , sulphite black liquor	n.a	n.a	DPPH assay	2.92 µg/ml	Faustino <i>et al.</i> , 2010
S2		n.a	n.a	DPPH assay	3.29 µg/ml	
S3		n.a	n.a	DPPH assay	2.98 µg/ml	
S4	The sulphite process is an acidic delignification process, whose cooking liquor is a mixture of free sulphurous acid and combined sulphurous acid in the form of bisulphite ion.	n.a	n.a	DPPH assay	3.12 µg/ml	
S5		n.a	n.a	DPPH assay	2.60 µg/ml	
S1					2.85 µg/ml	García <i>et al.</i> , 2010
S2		n.a	n.a	DPPH assay	5.22 µg/ml	
S3		n.a	n.a	DPPH assay	6.74 µg/ml	
S4		n.a	n.a	DPPH assay	11.47 µg/ml	
		n.a	n.a	DPPH assay		
	S1 – S5 were obtained at different pH (pH 1, 2, 4, 6 and 12)					
	S1 – S4 were separated based on chloroform/ethyl acetate					
	<i>Miscanthus sinensis</i> lignins					
HL	Autohydrolysis: Aqueous solution of 7.5% NaOH in weight, was carried out in a 20 l glass reactor during 90 min at 90°C, under the following conditions: solid/water ratio of 1:20, 180°C, 30min;	1085 g/mol	n.a	Folin-Ciocalteu DPPH assay	22.73 GAE/100 g lignin 35.61 %TAC, 60min	
SL	Alkaline: Aqueous solution of 7.5% NaOH in weight, was carried out in a 20 l glass reactor during 90 min at 90°C, using a solid/liquid ratio	5654 g/mol	n.a	Folin-Ciocalteu DPPH assay	14.19 GAE/100 g lignin 16.07 %TAC, 60min	
SL10	a 1:10, in a 4 l pressurized reactor (180°C, 90min) with constant stirring;	2022 g/mol	n.a	Folin-Ciocalteu DPPH assay	16.05 GAE/100g lignin 18.64 %TAC, 60min	
SL15		3544 g/mol	n.a	Folin-Ciocalteu DPPH assay	14.93 GAE/100g lignin 25.22 %TAC, 60min	

OL	Organosol: For this purpose, tubular ceramic membranes with cut-offs of 5, 10 and 15 kDa were used. The diameter of the membrane tubes was 10 mm, the length 250 mm and the area of each membrane tube was 110 cm ² . Liquors permeate between 5 and 10 kDa and between 10 and 15 kDa were collected.	2180 g/mol	n.a	Folin-Ciocalteu DPPH assay	17.62 GAE/100 g lignin 31.97 %TAC, 60min
OL10		1750 g/mol	n.a	Folin-Ciocalteu DPPH assay	18.24 GAE/100 g lignin 38.71 %TAC, 60min
OL15		1900 g/mol	n.a	Folin-Ciocalteu DPPH assay	19.68 GAE/100 g lignin 46.79 %TAC, 60min
GT	Green tea leaves Method of Björkman (1956) and acetone extraction	n.a	Green tea powder	Autoxidation of linoleic acid	Autoxidation of linoleic was reduced by 50 % in the presence of tea leaf lignin
GT-DF			Epigallocatechin gallate- 166.7 µg/mg acetone extract of green tea leaf powder (GT-AE)	POV	4.15 nmol/kg
GT-AE			Epigallocatechin – 113.7 µg/mg GT-AE	POV	19.15 nmol/kg
GTL			Epicatechin gallate- 26.7 µg/mg GT-AE	POV	100 nmol/kg
			Epicatechin – 24.8 µg/mg GT-AE	POV	0.27 nmol/kg
			α-tocoferol- 0.7 µg/mg GT-AE		
			Acetone extract of green tea leaf powder		
			Catechin 9.2 µg/mg GT- AE		
			Epicatechin 64.3 µg/mg GT-AE		
			Epicatechin gallate 64.9 µg/mg GT-AE		
			Epigallocatechin gallate 10.9 µg/mg GT-AE		
			α-tocoferol 0.4 µg/mg		

GT-AE						
	Hybrid poplar (<i>Populus nigra</i> x <i>P. maxmowtzii</i>)					Dong <i>et al.</i> , 2011
L1	Lignin extract 1 was prepared using alkaline extraction: T (°C) 95°; time (min) 120; 4% sodium hydroxide solution at a residue/solvent ratio (w/v) ¼	n.a	n.a	ORAC Folin-Ciocalteu	31119.68 µmol TE/g sample 200.40 mg/g	
L2	Lignin 2: T (°C) 95°; time (min) 120 and ratio (w/v) ½	n.a	n.a	ORAC Folin-Ciocalteu	1972.32 µmol TE/g sample 190.96 mg/g	
L3	Lignin 3: T (°C) 22°; time (min) 20 and ratio (w/v) ¼	n.a	n.a	ORAC Folin-Ciocalteu	1745.11 µmol TE/g sample; 179.63 mg/g;	
L4	Lignin 4: T (°C) 22° ; time (min) 20 and ratio (w/v) ½	n.a	n.a	ORAC Folin-Ciocalteu	1741.72 µmol TE/g sample 175.76 mg/g	
	Apple tree pruning residues		Lignin composition (%w/w on dry basis) 17.00±3.41		García <i>et al.</i> , 2012	
HYD	Water 30min, 180°C, S/L 1:10	4263 g/mol	1.03 Aliphatic Carbon, 0.18 O-C _{Ar} , 0.28 C-C _{Ar} , 0.54 H-C _{Ar}	Folin – Ciocalteu ABTS assay	751.18 GAE (mg/l) 89.73% reduction of ABTS _{734nm}	
AC1	Acetic acid-water 60% v/v, 150°C, S/L 1:10, 30, 45, 75 min respectively	16.391 g/mol	1.40 Aliphatic Carbon, 0.20 O-C _{Ar} , 0.25 C-C _{Ar} , 0.55 H-C _{Ar}	Folin – Ciocalteu ABTS assay	569.70 GAE (mg/l) 90.90% reduction of ABTS _{734nm}	
AC2		13.348 g/mol	1.77 Aliphatic Carbon,	Folin – Ciocalteu	590.91 GAE (mg/l)	

			0.16 O-C _{Ar} , 0.32 C-C _{Ar} , 0.52 H-C _{Ar}	ABTS assay	93.19% reduction of ABTS _{734nm}	
AC3		7175 g/mol	1.62 Aliphatic Carbon, 0.22 O-C _{Ar} , 0.31 C-C _{Ar} , 0.47 H-C _{Ar}	Folin – Ciocalteu ABTS assay	683.16 GAE (mg/l) 97.96% reduction of ABTS _{734nm}	
ET1	Ethanol-water, 60% v/v, 90min, 180°C, S/L 1:10	8810 g/mol	1.61 Aliphatic Carbon, 0.25 O-C _{Ar} , 0.23 C-C _{Ar} , 0.52 H-C _{Ar}	Folin – Ciocalteu ABTS assay	610.10 GAE (mg/l) 87.44% reduction of ABTS _{734nm}	
ET2	- ET1 - immediately precipitated - ET2 - precipitated after 24h	8294 g/mol	1.70 Aliphatic Carbon, 0.18 O-C _{Ar} , 0.26 C-C _{Ar} , 0.55 H-C _{Ar}	Folin – Ciocalteu ABTS assay	653.87 GAE (mg/l) 23.37% reduction of ABTS _{734nm}	
	Apple tree pruning waste Soda-water 7,5% w/w, 90min, 90°C (S), - S1. (S/L 1:18)		Lignin composition (%w/w on dry basis) 17.00±3.41			García <i>et al.</i> , 2012
S1.1	- S1.1 - Differential precipitation up to pH 5	5068 g/mol	4.38 Aliphatic Carbon, 0.04 O-C _{Ar} , 0.13 C-C _{Ar} , 0.83 H-C _{Ar}	Folin – Ciocalteu ABTS assay	87.54 GAE (mg/l) 23.37% reduction of ABTS _{734nm}	
S1.2	- S1.2 - between pH 5 and 2	8829 g/mol	5.26 Aliphatic Carbon, 0.00 O-C _{Ar} , 0.07 C-C _{Ar} , 0.93 H-C _{Ar}	Folin – Ciocalteu ABTS assay	219.53 GAE (mg/l) 41.68% reduction of ABTS _{734nm}	
S2.1	- S2. (S/L 1:10) - S2.1 - Differential precipitation between pH 4 and 2	23.868 g/mol	3.63 Aliphatic Carbon, 0.04 O-C _{Ar} , 0.25 C-C _{Ar} , 0.71 H-C _{Ar}	Folin – Ciocalteu ABTS assay	167.68 GAE (mg/l) 26.69% reduction of ABTS _{734nm}	
L _{M10}	<i>Phyllostachys sulphera</i> Two year-old Soxhlet extraction with toluene/ethanol (2:1, v/v)	C ₉ weight 200.48 g/mol	64.22 C, 5.49 H, 30.29 O, 18.80 OCH ₃	DPPH assay	0.35 mol reduced DPPH/mol lignin	Li <i>et al.</i> , 2012
L _{M60}		196.87 g/mol	62.21 C 5.56 H, 32.23 O, 18.89 OCH ₃	DPPH assay	0.53 mol reduced DPPH/mol lignin	
L _{H10}		195.70 g/mol	61.86 C, 5.62 H, 32.52 O, 19.25 OCH ₃	DPPH assay	0.69 mol reduced DPPH/mol lignin	

L ₄₆₀		189.04 g/mol	60.82 C, 5.62 H, 33.57 O, 19.18 OCH ₃	DPPH assay	1.15 mol reduced DPPH/mol lignin	
<i>Acanthopanax senticosus</i>						Lu <i>et al.</i> , 2012
Acetic acid-water lignin	4/1, v/v	n.a	18.31% of hydroxyl groups	DPPH assay	0.6 mg/ml	
1,4.butanediol-acetic acid-water lignin	8/1/1, v/v/v	n.a	14.67% of hydroxyl groups	DPPH assay	1.20 mg/ml	
Ethanol-acetic acid-water lignin	8/1/1, v/v/v	n.a	13.59% of hydroxyl groups	DPPH assay	1.25 mg/ml	
Acetone-acetic acid-water lignin	8/1/1, v/v/v	n.a	11.68% of hydroxyl groups	DPPH assay	1.60 mg/ml	
Kraft lignin	Commercial	n.a	6.11% of hydroxyl groups	DPPH assay	2.5 mg/ml	
Nanoscale lignin	Lignin of poplar 1,4 -butanediol-acetic acid-water (8/1/1, v/v/v) at 200°C for 2 h	n.a	n.a	DPPH assay SRSA assay	2.70 mg/ml; 1.41 mg/ml;	Lu <i>et al.</i> , 2012a
Non- nanoscale lignin		n.a	n.a	DPPH assay SRSA assay	32.21 mg/ml 15.49 mg/ml	
E TEK lignin						Nsimba <i>et al.</i> , 2012
EEL	Extract ETEK lignin	n.a	7.3±0.02 nmol ArOH/g of lignin, 3.0±0.06 nmol AlkOH/g of lignin, 3.0±0.06 nmol MeO /g of lignin	DPPH assay ABTS assay	188.0 µg/ml 310.0 µg/ml	
MI	Methanol insoluble	n.a	4.6±0.10 nmol ArOH/g of lignin, 6.6±0.14 nmol AlkOH/g of lignin, n.d nmol MeO /g of lignin	DPPH assay ABTS assay	218.0 µg/ml n.d	
WI	Water immersed	n.a	9.7±0.82 nmol ArOH/g of lignin, 4.6±0.18 nmol AlkOH/g of lignin, 0.9±0.06 nmol MeO /g of lignin	DPPH assay ABTS assay	75.0 µg/ml 194.0 µg/ml	

DI	Dichloromethane insoluble	n.a	11.5±0.22 nmol ArOH/g of lignin, 3.6±0.03 nmol AlkOH/g of lignin, 0.9±0.03 nmol MeO /g of lignin	DPPH assay ABTS assay	76.0 µg/ml 216.0 µg/ml
DS	Dichloromethane soluble	n.a	17.6±0.32 nmol ArOH/g of lignin, 8.2±0.25 nmol AlkOH/g of lignin, 1.4±0.56 nmol MeO /g of lignin	DPPH assay ABTS assay	39.0 µg/ml 174.0 µg/ml
<i>Betula alnoides</i>					
					Zhou <i>et al.</i> , 2012
	88% formic acid solution at boiling point (101°C) under atmospheric pressure				
MWL	Milled wood lignin	10860 g/mol	58.01 C, 6.35 H, 35.64 O, 20.47 OCH ₃ ;	DPPH assay	1.20 mol reduced DPPH/mol lignin
ML ₃₀	Lignin sample extracted under microwave heating for 30 min C: 57.13	7290 g/mol	57.13 C, 5.67 H, 37.20 O, 21.60 OCH ₃ ;	DPPH assay	0.87 mol reduced DPPH/mol lignin
OL ₆₀	Oil bath heating for 60 min	11450 g/mol	56.73 C, 5.81 H, 37.46 O, 21.60 OCH ₃ ;	DPPH assay	0.53 mol reduced DPPH/mol lignin
<i>Acacia nilotica</i>					
					Aadil <i>et al.</i> , 2014
A1	Alkaline – various concentration of NaOH (0.1, 0.2, 0.3 and 0.4N) at 120°C for 45 min, the solid/liquid ratio was kept at 1:15 (w/v)	n.a	1.13±0.22 mg/g of Carbohydrates, 0.74±0.01 % of Phenolic hydroxyl groups	Folin-Ciocalteu DPPH assay ABTS assay FRAP assay PMA assay	232.48 µg of GAE per mg 83.85 µg/ml 2.84 µg/ml 165.36 µmol of GAE
			1.31±0.07 %w/w of Carboxyl groups	HPS-CUPRAC assay RP assay	120.55 mmol/100 mg AEE 139.2 µg/ml 99.4 µg/ml
A2		n.a	0.61±0.24 mg/g of Carbohydrates, 2.73±0.04 % of Phenolic hydroxyl groups	Folin-Ciocalteu DPPH assay ABTS assay FRAP assay PMA assay	73.01 µg of GAE per mg 103.86 µg/ml 3.25 µg/ml 26.01 µmol of GAE 108.88 mmol/100 mg AEE

			2.73±0.10	%w/w	of	HPS-CUPRAC assay Carboxyl groups	107.67 µg/ml 20.7 µg/ml
A3		n.a	1.04±0.35	mg/g	of	Folin-Ciocalteu Carbohydrates, DPPH assay 0.14±0.01 % of ABTS assay Phenolic hydroxyl FRAP assay groups PMA assay	102.27 µg of GAE per mg 110.48 µg/ml 3.15 µg/ml 55.92 µmol of GAE 97.77 mmol/100 mg AEE
			2.62±0.03	%w/w	of	HPS-CUPRAC assay Carboxyl groups	175.08 µg/ml 35.6 µg/ml
A4		n.a	0.87±0.08	mg/g	of	Folin-Ciocalteu Carbohydrates, DPPH assay 0.53±0.03 % of ABTS assay Phenolic hydroxyl FRAP assay groups PMA assay	87.74 µg of GAE per mg 128.21 µg/ml 3.95 µg/ml 40.64 µmol of GAE 71.10 mmol/100 mg AEE
			1.70±0.08	%w/w	of	HPS-CUPRAC assay Carboxyl groups	162.20 µg/ml 25.3 µg/ml
HWL	Organosolv – using Soxhlet apparatus with different aqueous solution (v/v) of organic solvents (acetone 60% (AEL), ethanol 70% (EEL), methanol 80% (MEL), propanol 80% (PEL)), using a	n.a	4.50±0.11	mg/g	of	Folin-Ciocalteu Carbohydrates, DPPH assay 1.79±0.02 % of ABTS assay Phenolic hydroxyl FRAP assay groups PMA assay	295.21 of GAE per mg 81.46 µg/ml 2.78 µg/ml 241.94 µmol of GAE 175.92 mmol/100 mg AEE
	solid/liquid ratio of 1:10. Hot water was carried for 45 min at 120°C, using solid/liquid ratio of 1:10 (g/ml) (HWL)		1.61±0.02	%w/w	of	HPS-CUPRAC assay Carboxyl groups	161.23 µg/ml 125.8 µg/ml
AEL		n.a	8.26±0.07	mg/g	of	Folin-Ciocalteu Carbohydrates, DPPH assay 2.41±0.03 % of ABTS assay Phenolic hydroxyl FRAP assay groups PMA assay	343.28 of GAE per mg 79.89 µg/ml 2.95 µg/ml 294.16 µmol of GAE 342.2 mmol/100 mg AEE
			1.59±0.09	%w/w	of	HPS-CUPRAC assay Carboxyl groups	114.7 µg/ml 196 µg/ml
EEL		n.a	6.76±0.51	mg/g	of	Folin-Ciocalteu Carbohydrates, DPPH assay 3.05±0.05 % of ABTS assay Phenolic hydroxyl FRAP assay groups PMA assay	229.54 of GAE per mg 81.72 µg/ml 2.77 µg/ml 157.40 µmol of GAE 167.58 mmol/100 mg AEE
			2.10±0.05	%w/w	of	HPS-CUPRAC assay Carboxyl groups	121.4 µg/ml 138.5 µg/ml
MEL		n.a	7.07±1.75	mg/g	of	Folin-Ciocalteu Carbohydrates, DPPH assay	393.30 of GAE per mg 84.58 µg/ml

				2.79±0.07 % of Phenolic hydroxyl groups		ABTS assay FRAP assay PMA assay	n.d 273.23 µmol of GAE 211.47 mmol/100 mg AEE
				1.76±0.04 %w/w of Carboxyl groups		HPS-CUPRAC assay RP assay	110.7 µg/ml 140.6 µg/ml
PEL		n.a		4.87±0.03 mg/g of Carbohydrates,		Folin-Ciocalteu DPPH assay	208.28 of GAE per mg 82.64 µg/ml
				3.29±0.09 % of Phenolic hydroxyl groups		ABTS assay FRAP assay PMA assay	n.d 66.47 µmol of GAE 54.44 mmol/100 mg AEE
				1.43±0.07 %w/w of Carboxyl groups		HPS-CUPRAC assay RP assay	101.8 µg/ml 2.33 µg/ml
LS	Commercial	n.a		5.22±0.16 mg/g of Carbohydrates,		Folin-Ciocalteu DPPH assay	100.27 of GAE per mg 149.96 µg/ml
				0.52±0.22 % of Phenolic hydroxyl groups		ABTS assay FRAP assay PMA assay	2.70 µg/ml 43.05 µmol of GAE 67.96 mmol/100 mg AEE
				1.53±0.04 %w/w of Carboxyl groups		HPS-CUPRAC assay RP assay	178.61 µg/ml 19.8 µg/ml
<hr/>							
				<i>Phyllostachys pubescan</i>			Sun et al., 2014
				In this study, steam explosion was conducted at 1.8 and 2.0 MPa for 5 min (samples 1 and 2), and 2.0 MPa for 8 min (sample 3), respectively.			
L1a	L1a, L2a, L3a		860 g/mol	n.a		DPPH assay	5.56 mol reduced DPPH/mol lignin
L2a	represented the degraded acid-insoluble lignin		1030 g/mol	n.a		DPPH assay	5.26 mol reduced DPPH/mol lignin
L3a	fractions isolated by extraction with 0.5% NaOH.		1150 g/mol	n.a		DPPH assay	5.13 mol reduced DPPH/mol lignin
L1b			1190 g/mol	n.a		DPPH assay	4.26 mol reduced DPPH/mol lignin
L2b			1080 g/mol	n.a		DPPH assay	3.08 mol reduced DPPH/mol lignin
L3b	L1b, L2b, L3b		970 g/mol	n.a		DPPH assay	2.02 mol reduced DPPH/mol lignin
							represented the degraded acid-insoluble lignin fractions isolated by extraction with 60% ethanol containing 1.5%

	NaOH from the corresponding steam-exploded samples 1, 2, and 3, respectively					
2-Methoxy ethanol and dimethyl sulfoxide	Commercial	n.a	202 mg GAE/g extract 13 CE/g extract	ABTS assay FRAP assay	149 mg vit. C eq/g extract 97.5 mg vit. C eq ferric reducing capacity/g extract	Naik <i>et al.</i> , 2013
	Palm oil extraction (black liquor waste)	n.a	201 mg GAE/g extract 11 CAE/g extract	ABTS assay FRAP assay	152 mg vit. C eq/g extract 100 mg vit. C eq ferric reducing capacity/g extract	

AAPH- 2,2'-azobis(2-aminodinopropane); ABTS- 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid); AEE- ascorbic acid equivalents; CAE- catechin equivalents; DHP-FA- Dehydrogenation polymers of ferulic acid; DHP-pCA – Dehydrogenation polymers of p-coumaric acid; DPPH- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; FRAP- ferric reducing antioxidant power assay; g - grams; g/ml - grams/milliliter ratio; G6PD-Glucose-6-phosphate dehydrogenase; GAE- Gallic acid equivalents; GT- Green tea leaf lignin; GT-AE- Acetone extract of green tea leaf powder; GT-DF- Defatted green tea leaf powder; GTL- Green tea leaf lignin; HPS-CUPRAC assay cupric reducing antioxidant capacity; mg – Micrograms; mg - milligrams; min - Minutes; n.a.- not available; NADPH - Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; ORAC- Hydrophilic oxygen radical absorbance capacity; PMA- Phosphomolybdate assay; POV- Peroxide value; RP- Reducing power; S/L - solid/liquid ratio; SOD- Superoxide dismutase; SRSA- Superoxide radical scavenging activities; T (°C) - Temperature in degrees Celsius; TAC- total antioxidant capacity (i.e., as the percentage respect to the reduction in absorbance observed for the DPPH with Trolox just after mixing; t = 0min); TBARS – Thiobarbituric acid reactive substances; TE - Trolox equivalents; v/v - volume/volume ratio; vit. C - Vitamin C; w/v - water/volume ratio; w/w - water/water ratio.

Tabela 3 – Revisão bibliográfica relativa à atividade antitumoral de diferentes tipos de lenhinas e compostos relacionados.

Samples	Origin	Molecular weight	Chemical composition	Cytotoxicity assays/cell lines	Cytotoxicity results/GI ₅₀ values	References
Intact Acid-treated NaClO ₂ -treated Synthetic lignin	Pine cone of <i>Pinus parviflora</i> Boiling in water for several hours and periodically replacing the water. For purification of the differentiaton-inducing substances DEAE-Sepharose CL-6B further fractionated the post Sephadex fraction. The differentiation-inducing activity, which 0.15M NaOH after washing with 1M NaCl solutions.	n.a n.a n.a n.a	n.a n.a n.a n.a	<i>In vivo</i> assay: Solid sarcoma-180 cells transplanted in mice. <i>In vitro</i> assay: Poly (ADP-ribose) glycohydrolase; RNA-dependent	Inhibited the growth of both ascites and solid sarcoma-180 cells transplanted in mice. Inhibited the enzyme activity. 100 µg/ml	Sakagami <i>et al.</i> , 1991
Alkali-lignin	Commercial	n.a	n.a	MTT assay (4 days incubation)/HeLa S3 cells human promyelocytic leukemia cells /Leukemic HL-60cells	361.4 µg/ml 488 µg/ml	Lu <i>et al.</i> , 1998 Sakagami <i>et al.</i> , 1999
Fr. VI Fr. VII	Pine cone of <i>Pinus parviflora</i> Extraction with 1%NaOH; centrifugation; acidification of the supernatant to 5.0 with acetic acid; the precipitate was collected by centrifugation (Fr. VI), and the supernatant was successively precipitate with 1 vol ethanol (Fr. VII)	n.a n.a	n.a n.a	human promyelocytic leukemia cells /Leukemic HL-60cells	516 µg/ml 492 µg/ml	Sakagami <i>et al.</i> , 1999; Sakagami <i>et al.</i> , 1987
Lignin-sulfonate	Commercial	n.a	n.a	human promyelocytic leukemia cells /Leukemic HL-60cells NRU assay (48h incubation)/ HaCat cells NRU assay (48h incubation)/ 3T3 cells	1077 µg/ml 600 µg/ml 900 µg/ml	Sakagami <i>et al.</i> , 1999 Ugartondo <i>et al.</i> , 2008
DHP-pCA DHP-FA	Synthetic lignins	n.a	n.a	human promyelocytic leukemia cells /Leukemic HL-60cells	243 µg/ml 364 µg/ml	Sakagami <i>et al.</i> , 1999
Bagasse	Commercial	n.a	n.a	NRU assay (48h incubation)/ HaCat cells NRU assay (48h incubation)/ 3T3 cells	400 µg/ml 600 µg/ml	Ugartondo <i>et al.</i> , 2008
Curan 100	Commercial	n.a	n.a	NRU assay (48h incubation)/ HaCat cells	400 µg/ml	Ugartondo <i>et al.</i> , 2008

				NRU assay (48h incubation)/ 3T3 cells	400 µg/ml	
Steam explosion	Commercial	n.a	n.a	NRU assay (48h incubation)/ HaCat cells	410 µg/ml	Ugartondo <i>et al.</i> , 2008
				NRU assay (48h incubation)/ 3T3 cells	600 µg/ml	
Condensed spruce kraft lignin	Condensed kraft lignin was prepared by treatment of lignin with diluted sulphuric acid, afterwards, the mixture was diluted with water and condensed lignin was filtered, washed and dried.	8800 g/mol	n.a	SOS-chromotest/Cell line VH10, V79 and Caco-2 with treated lignins H ₂ O ₂ and MNNG respectively	30 mean of % tail DNA for V10 and Caco-2 and 20 mean of % tail DNA for V79 30 mean of % tail DNA for V10 and V79 and 50% mean of % tail DNA for Caco-2	Kosikova <i>et al.</i> , 2002
Beech prehydrolysis lignin	Prehydrolysis lignin obtained beech wood prehydrolysis (170°C, 1h) in the first step of kraft pulping. Gel permeation chromatography was performed on a column (53x8 cm ²) os Sephadex LH 60 using mixture of dioxane and water containing 0.005 M aqueous NaOH and 0.001 M LiCl (7:3) as the eluant	2000 g/mol	n.a	SOS-chromotest/Cell line, V79 and Caco-2 with treated lignins H ₂ O ₂ and MNNG respectively	22% mean of % tail DNA for Caco-2 and 40% mean of % tail DNA for V79 30% mean of % tail DNA for Caco-2 and V79	
Alcell lignin	Commercial; extracted from a mixture of hardwoods (maple, birch, poplar) by an organosolv process using aqueous ethanol	n.a	n.a	MTT assay (72h incubation)/PBMC	1% linked to hydroxyapatite- no toxicity 10% linked to hydroxyapatite- slight toxicity	Erakovic <i>et al.</i> , 2012
2-Methoxy ethanol and dimethyl sulfoxide	Commercial Palm oil extraction (black liquor waste)	n.a n.a	202 mg GAE/g extract 13 CE/g extract 201 mg GAE/g extract 11 CE/g extract	MN assay (30h incubation)/Mouse bone marrow cells after oral gavage	50, 100 and 200 mg/kg b.w.- Exerted modulatory effect on cyclophosphamide (50 mg/kg) induced genotoxicity and cytotoxicity in the cells	Naik <i>et al.</i> , 2013

°C - Celsius; 3T3 cells- cell type fibroblast, organism *Mus musculus*, tissue embryo; CAE- catechin equivalents; CE- catechin equivalents;

Cellular line Caco-2 - cells of epithelial type, organism *Homo sapiens*, colon tissue; Cellular line V79 - fibroblast-like cells, body *Cricetulus grilus* (hamster, Chinese), lung tissue; DHP-FA- Dehydrogenation polymers of ferulic acid; DHP-pCA- Dehydrogenation polymers of *p*-coumaric acid; DNA - Deoxyribonucleic Acid; g/ml - grams/milliliter ratio; GAE- Gallic acid equivalents; h - Hours; HaCat cells- cell type keratinocyte, organism *Homo sapiens*, tissue skin, no tumorigenic; HeLa S3 cells- Cell type adenocarcinoma, organism *Homo sapiens*, tissue cervix; Leukemic HL 60 cells- cell type promyeloblast, organism *Homo sapiens*, tissue peripheral blood; mg/kg - milligrams/kilograms ratio; MN assay- bone marrow micronucleus assay; MNNG- N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; MTT assay- 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenil) tetrazolium bromide method; NRU assay- neutral red uptake assay; PBMC- Peripheral blood mononuclear cells; RNA - ribonucleic acid; Sarcoma 180 cells – cell type sarcoma, organism *Mus musculus*, tissue ascites, tumorigenic, SOS-chromotest - assay based on the induction of the SOS repair system for the detection of genotoxic substances.

III. Materiais e métodos

3.1. Lenhinas em estudo

As lenhinas que foram utilizadas para o estudo da bioatividade são consideradas lenhinas técnicas; estas representam três processos de deslenhificação (Kraft, Soda e Organosolv) e diferentes origens botânicas (madeiras de coníferas, madeira de folhosas e lenhinas não lenhosas).

As lenhinas Indulin-AT e Curan-27-11P (comercializada na forma alcalina) são lenhinas resinosas que foram obtidas pelo processo Kraft. Foram obtidas comercialmente na MeadWestvaco (Glen Allen, VA) e BorregaardLignoTech (Sarpsborg, Noruega), respectivamente. A Sarkanda foi fornecida pela Granit SA (Lausanne, Suíça) e é uma lenhina não lenhosa, sendo obtida a partir de um processo de deslenhificação por processo soda, patenteado pela Granit SA. A lenhina Alcell foi fornecida pela Repap Enterprises Inc. (Stamford, CT) e foi obtida de uma mistura de folhosas (*Acer platanoides*, *Betula pendula* e choupo- *Populus*) por um processo Organosolv usando uma mistura etanol-água.

As lenhinas referidas foram completamente caracterizadas em estudos anteriores (Cateto *et al.*, 2008) tendo sido determinados o teor em cinzas; a acidez/alcalinidade; realizada análise elementar; os açúcares; o teor de grupos hidroxilos e a massa molecular. Foram aplicadas técnicas de análise termogravimétrica (TGA), calorimetria de varrimento diferencial (DSC) e espectroscopia de infravermelhos (FTIR) e ¹³C-RMN para análise estrutural, bem como várias técnicas complementares para a determinação de grupos hidroxilo (¹³C-RMN de amostras acetiladas, ³¹P-RMN de lenhinas fosfitiladas, e titulação de acordo com a norma (E) ISO 14900:2001.

A lenhina Sarkanda é considerada uma lenhina do tipo *p*-hidroxifenilogauiacilo-siringilo (HGS), possuindo um elevado teor de açúcares e acidez. A lenhina Curan-27-11P é do tipo guaiacilo, apresentando um elevado teor de cinzas. A lenhina Alcell é do tipo guaiacilo-siringilo e a Indulin-AT do tipo guaiacilo. Das quatro

lenhinas, a que apresenta maior pureza é a Alcell, sendo também a que possui menor massa molecular. As lenhinas Alcell e Sarkanda têm aproximadamente o mesmo conteúdo total de grupos hidroxilo. A Sarkanda possui uma quantidade inferior de grupos hidroxilo fenólicos, enquanto a Alcell tem menor quantidade de grupos hidroxilo alifáticos (**Tabela 1**) (Cateto, 2008; Cateto *et al.* 2008).

3.2. Métodos para a avaliação da bioatividade

3.2.1. Padrões e reagentes

O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, Massachusetts, EUA). Os restantes reagentes químicos utilizados foram adquiridos na Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri, EUA). O Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) foi adquirido à Sigma (St. Louis, MO, EUA).

O soro fetal bovino (FBS), 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 de 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).

3.2.2. Preparação das amostras

As amostras de lenhinas descritas anteriormente na secção 3.1. (10 mg) foram diluídas em DMSO:água (50:50 v/v) para preparar soluções iniciais de cada amostra (1 mg/ml e 8 mg/ml para os ensaios *in vitro* de avaliação da atividade

antioxidante e antitumoral, respetivamente). A partir das soluções iniciais foram preparadas várias soluções com diferentes concentrações, através do método das diluições sucessivas. As soluções foram utilizadas nos diferentes ensaios, sendo mantidas a uma temperatura de 4°C.

3.2.3. Avaliação da atividade antioxidante

3.2.3.1. Atividade captadora de radicais DPPH

A atividade captadora de radicais DPPH foi monitorizada num leitor de microplacas ELX800 (Bio-Tek Instruments, Winooski, Vermont, EUA). As soluções que foram previamente preparadas (30 µl) foram colocadas nos diferentes poços das microplacas (96 poços) e, posteriormente, foram adicionados 270 µl de uma solução de DPPH (6×10^{-5} mol/l). A mistura foi colocada no escuro por 60 minutos e a absorvância foi medida a um comprimento de onda de 515 nm. A atividade captadora de radicais (ACR) foi calculada como percentagem de descoloração da solução DPPH utilizando a fórmula $\% \text{ ACR} = \left(\frac{\text{Abs}_{\text{DPPH}} - \text{Abs}_{\text{S}}}{\text{Abs}_{\text{DPPH}}} \right) \times 100$, onde Abs_{DPPH} corresponde à absorvância da solução de DPPH e Abs_{S} à absorvância da solução de DPPH na presença da amostra. O valor da concentração efetiva de amostra responsável pela captação de 50% de radicais DPPH, EC_{50} , foi calculado por interpolação gráfica da percentagem de ACR em função da concentração da amostra. Utilizou-se o trolox como controlo positivo.

3.2.3.2. Poder redutor pelo ensaio do ferricianeto/azul da Prússia

Adicionou-se a 500 µl das soluções previamente preparadas, 500 µl de ferricianeto de potássio (1% m/v) e tampão fosfato de sódio (0,2 mol/l, pH 6,6). Após colocar a incubar durante 20 min a 50°C, adicionou-se 500 µl de ácido tricloroacético a 10%. As misturas de 800 µl foram colocadas em poços de microplacas (48 poços) contendo 800 µl de água desionizada. Por fim, foram adicionados 160 µl de cloreto férrico a 0,1%, e os valores de absorvância foram lidos a 690 nm no leitor de

microplacas descrito anteriormente. A concentração de amostra correspondente a uma absorvância de 0,5 (EC₅₀) foi calculada por interpolação gráfica da absorvância em função da concentração da amostra. Utilizou-se o trolox como controlo positivo.

3.2.3.3. Inibição da peroxidação lipídica pelo ensaio β-caroteno/linoleato

Preparou-se inicialmente uma solução de β-caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 ml); posteriormente, pipetou-se 2 ml desta solução para um balão periforme de 100 ml. O clorofórmio foi removido a 40°C sob vácuo. A esta solução foram adicionados aproximadamente 40 mg de ácido linoleico, 400 mg de emulsificador Tween®80 e 100 ml de água desionizada. Após agitar vigorosamente esta solução, até obter uma emulsão perfeita, foram transferidos alíquotas de 4,8 ml para tubos de ensaio contendo 200 µl das soluções das amostras. Imediatamente após esta adição, a absorvância da mistura foi determinada a 470 nm de modo a obter a medição do tempo inicial (T₀). De seguida, os tubos de ensaio foram colocados sob agitação num banho a 50°C durante 2h, após as quais foram novamente medidos os valores de absorvância ao mesmo comprimento de onda. A inibição da descoloração do β-caroteno foi calculada utilizando a seguinte equação $\frac{Abs_{470\text{após}2h}}{Abs_{470\text{inicial}}} \times 100$. A concentração de amostra correspondente a 50% da atividade antioxidante (EC₅₀) foi calculada por interpolação gráfica da percentagem da inibição da descoloração do β-caroteno em função da concentração de amostra. Utilizou-se o trolox como controlo positivo.

3.2.4. Avaliação do potencial antitumoral

Foram utilizadas cinco linhas celulares tumorais humanas: MCF-7 (carcinoma de mama), NCI-H460 (carcinoma de pulmão), HCT-15 (carcinoma de cólon), HeLa (carcinoma cervical) e HepG2 (carcinoma hepatocelular). As células foram mantidas em cultura de células aderentes em meio RPMI-1640 contendo 10% de Soro Fetal de Bovino (FBS) inativado pelo calor e 2 mM de glutamina (aminoácido) (MCF-7, NCI-H460 e HCT-15) ou em DMEM suplementado com 10% FBS, 2 mM glutamina (aminoácido), 100 U/ml penicilina (antibiótico) e 100 mg/ml

de estreptomicina (antibiótico) (HeLa e HepG2), a 37°C, em incubadora com temperatura humidificada contendo 5% de CO₂ (HF 151, Heal Force). Todas as experiências foram realizadas em ambiente assético 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, 2ml) e após a sua remoção adicionou-se tripsina (desagregar as células) (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 para HeLa e HepG2) numa placa de 96 poços. Adicionaram-se 5 diluições das amostras de lenhina (10 µl) em cada poço, num total de três repetições cada, 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% cido 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 no leitor de microplacas (referido anteriormente). Os resultados foram expressos em valores de GI₅₀ (concentração de amostra responsável pela inibição de 50% do crescimento celular), através de uma reta. Utilizou-se a elipticina como controlo positivo. Foi calculada utilizando as seguintes equações, em que OD corresponde à densidade ótica (absorvância).

% de control de crescimento celular

$$= \frac{\text{Média OD amostra} - \text{media OD dia 0}}{\text{Média OD control} - \text{media OD dia 0}} \times 100$$

% inibição do crescimento = 100 - % de control de crescimento celular

3.2.5. Avaliação da 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 (Abreu *et al.*, 2011). Os tecidos foram lavados em solução salina de Hank contendo 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina e dividido em explantes de 1x1 mm³. Os explantes foram colocados em caixas de cultura com meio DMEM suplementado com FBS (10%), 2 mM de aminoácidos não essenciais, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina, e colocou-se na incubadora. O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias, monitorizando-se utilizando um microscópio invertido (Nikon Eclipse Ts 100). As células foram transferidas para uma placa de 96 poços com uma densidade de 1x10⁴ células/poço, e cultivadas em meio DMEM com 10% de FBS, 100 U/ml de penicilina (antibiótico) e 100 µg/ml de estreptomicina (antibiótico). As células foram tratadas com diferentes concentrações de amostra e efetuou-se o teste SRB descrito anteriormente. Os resultados foram expressos em valores de GI₅₀ (concentração de amostra responsável pela inibição de 50% do crescimento celular), através de uma reta. Utilizou-se a elipticina como controlo positivo. Foi calculada utilizando as seguintes equações, em que OD corresponde à densidade ótica (absorvância).

% de control de crescimento celular

$$= \frac{\text{Média OD amostra} - \text{media OD dia 0}}{\text{Média OD control} - \text{media OD dia 0}} \times 100$$

% inibição do crescimento = 100 - % de control de crescimento celular

3.3. Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicado em experiências independentes. Os resultados foram expressos em valores médios e desvios-padrão (SD). Os resultados foram analisados por uma análise de variância (ANOVA) seguida de teste HSD Tukey's com $\alpha = 0,05$. Este tratamento estatístico foi realizado por SPSS v. 22.

IV. Resultados e discussão

A caracterização química e estrutural aqui discutida baseia-se no trabalho de Cateto (2008). Em síntese, as características estruturais evidenciadas nos espectros de ^{13}C -RMN, indicam que as lenhinas Alcell e Sarkanda são do tipo guaiacilo-siringilo (GS) e *p*-hidroxifenilo-guaiacilo-siringilo (HGS), respectivamente, enquanto as lenhinas Indulin AT e Curan 27-11P são do tipo guaiacilo (G). Estes dados foram também confirmados por análise FTIR. Na lenhina Alcell, a quantidade de estruturas fenólicas siringilo foi superior às de guaiacilo, sendo apenas detetada uma pequena quantidade de estruturas de *p*-hidroxifenilo. A lenhina Sarkanda, obtida a partir de resíduos agrícolas (trigo e cânhamo), apresentou uma proporção similar das três estruturas (G/S/H). Outra característica importante relacionada com a lenhina Sarkanda é a evidência da presença de ácidos carboxílicos. Tal como esperado para as lenhinas de madeiras folhosas, a lenhina Alcell apresentou um teor elevado de OCH_3 . Para todas as amostras estudadas foi observada uma predominância de ligações éter do tipo β -O-4 juntamente com um pequeno número de ligações β - β e 5-5' carbono-carbono.

A determinação dos grupos hidroxilos (**Tabela 4 e gráfico 1**) revelou que as lenhinas Indulin AT e Curan 27-11P (lenhinas de resinosas) apresentaram o maior teor destes grupos, 6,99 e 6,21 mmol/g, respectivamente. As lenhinas Alcell e Sarkanda possuem aproximadamente o mesmo conteúdo total de grupos hidroxilo (5,26 mmol/g). Os valores obtidos para os grupos hidroxilo fenólicos foram semelhantes para as lenhinas Alcell, Indulin AT e Curan 27-11P. A lenhina Sarkanda apresentou a menor quantidade de grupos hidroxilo fenólicos, enquanto a lenhina Alcell revelou a menor quantidade de grupos hidroxilo alifáticos.

Tabela 4 - Teor de grupos hidroxilo nas lenhinas estudadas (Adaptada de Cateto (2008)).

Lenhina	Total OH	OH Alifático	OH Fenólico	S-OH	G-OH	H-OH	5-condensado	Ácidos
Alcell	5,26	1,45	3,81	1,63	0,80	0,13	1,18	0,23
Sarkanda	5,26	2,85	2,41	0,80	0,82	0,62	0,65	0,62
Indulin AT	6,99	3,04	3,95	0,33	1,96	0,39	1,58	0,39
Curan 27-11P	6,21	2,58	3,63	0,29	2,01	0,47	1,49	0,47

S – siringilo, G- guaiacilo, H - *p*-hidroxifenilo

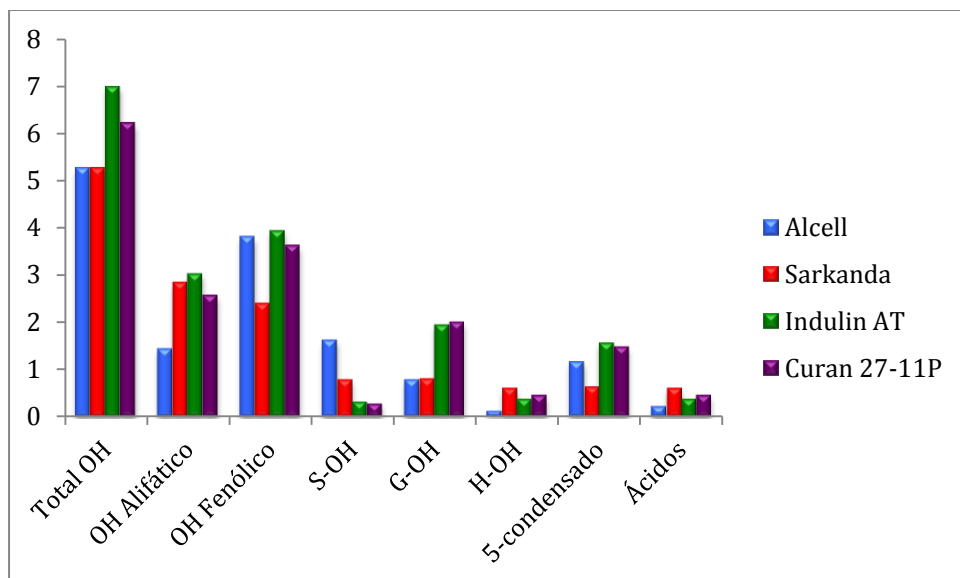


Gráfico 1 - Representação gráfica do teor de grupos hidroxilo nas lenhinas estudadas (Adaptada de Cateto 2008).

Todas as lenhinas técnicas testadas mostraram possuir atividade antioxidante (**Tabela 5 e gráfico 2**) e atividade antitumoral para as cinco linhas celulares diferentes (**Tabela 6 e gráfico 3**). Verifica-se que relativamente à linha celular NCI-H460 (carcinoma do pulmão) apenas Alcell possui atividade antitumoral ($197,74 \pm 15,32 \mu\text{g/ml}$) (**Tabela 5**). Relativamente ao ensaio da citotoxicidade efetuado em células de fígado de porco não tumorais (PLP2), demonstra-se que nenhuma das lenhinas estudadas apresenta toxicidade ($>400 \mu\text{g/ml}$) (**Tabela 6**).

Tabela 5 - Atividade antioxidante expressa em valores de EC_{50} ($\mu\text{g/ml}$) das lenhinas estudadas.

	Alcell	Sarkanda	Indulin AT	Curan 27-11P
Atividade captadora de radicais DPPH	$62,97 \pm 1,88^d$	$280,91 \pm 19,30^c$	$367,14 \pm 6,74^b$	$812,75 \pm 25,83^a$
Poder redutor	$950,21 \pm 32,29^a$	$327,37 \pm 1,41^c$	$151,47 \pm 2,33^d$	$822,30 \pm 6,17^b$
Inibição da descoloração β -caroteno	$26,50 \pm 0,46^c$	$119,68 \pm 5,34^b$	$92,03 \pm 1,41^b$	$272,17 \pm 10,39^a$

DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo; Valores expressos em EC_{50} , concentração de amostra correspondente a 50% de atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor. Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas ($p < 0,05$).

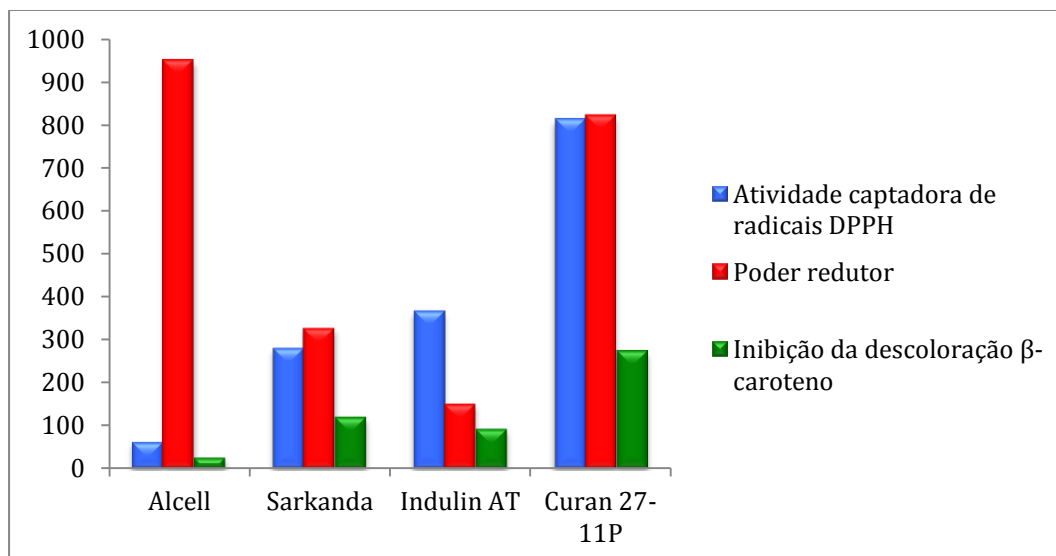


Gráfico 2 – Representação gráfica da atividade antioxidante expressa em valores de EC₅₀ (µg/ml) das lenhinas estudadas.

Tabela 6 - Atividade antitumoral e citotoxicidade nas células primárias de fígado, expressa em valores de GI₅₀ (µg/ml), das lenhinas estudadas.

	Alcell	Sarkanda	Indulin AT	Curan 27-11P
MCF-7 (carcinoma da mama)	59,44±3,98 ^d	286,32±15,16 ^a	95,60±6,40 ^c	220,83±10,93 ^b
NCI-H460 (carcinoma de pulmão)	197,74±15,32	>400	>400	>400
HCT-15 (carcinoma do cólon)	56,42±0,89 ^c	105,93±8,94 ^a	86,89±1,26 ^b	96,98±0,21 ^{ab}
HeLa (carcinoma cervical)	16,97±3,27 ^c	85,46±1,10 ^a	57,35±2,95 ^b	82,18±5,54 ^a
HepG2 (carcinoma hepatocelular)	45,61±1,62 ^b	78,79±7,38 ^a	73,50±2,95 ^a	71,33±5,47 ^a
PLP2 (células de fígado não tumorais)	>400	>400	>400	>400

Valores expressos em GI₅₀, concentração de amostra responsável por 50% de inibição do crescimento celular. Em cada linha, letras diferentes significam diferenças significativas (p<0,05).

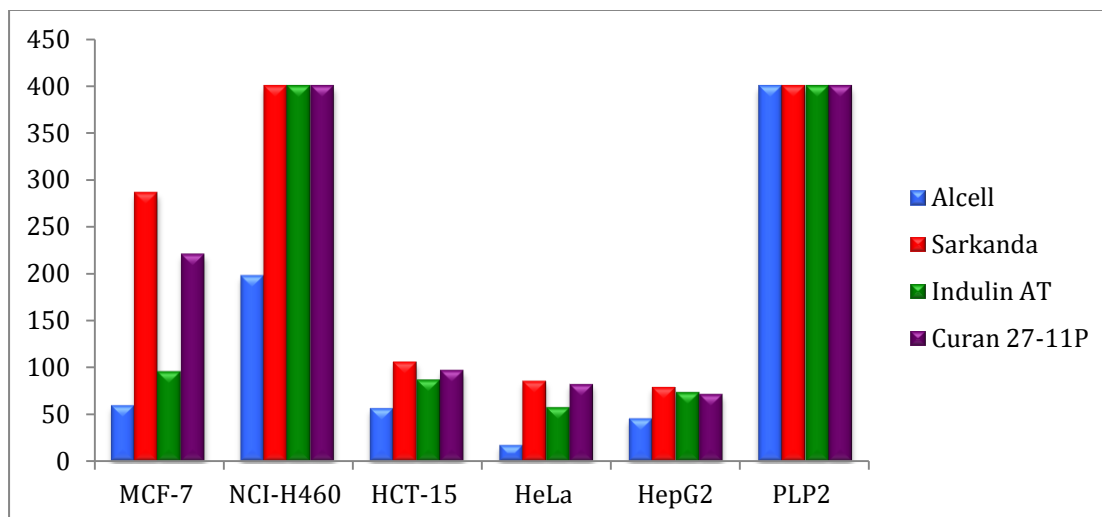


Gráfico 3 – Representação gráfica da Atividade antitumoral e citotoxicidade nas células primárias de fígado, expressa em valores de GI₅₀ (µg/ml), das lenhinas estudadas.

A lenhina Alcell superou claramente as outras amostras, quer através da sua atividade antioxidante, particularmente no ensaio de captação de radicais DPPH (EC₅₀=63 µg/ml) e na inibição da peroxidação lipídica pelo ensaio β - caroteno/linoleato (EC₅₀=26 µg/ml), quer nos ensaios de inibição do crescimento de células tumorais humanas, na linha celular HCT-15 (carcinoma do cólon, GI₅₀=56 µg/ml), na linha celular HeLa (carcinoma cervical, GI₅₀=17 µg/ml) e na linha celular HepG2 (carcinoma hepatocelular, GI₅₀=46 µg/ml). Esta lenhina foi também a única que mostrou atividade contra a linha celular NCI-H460 (carcinoma do pulmão).

A lenhina Indulin-AT revelou o maior poder redutor (EC₅₀=151 µg/ml), enquanto a lenhina Sarkanda originou a maior inibição do crescimento de células na linha MCF-7 (carcinoma da mama, GI₅₀=28 µg/ml). Até 400 µg/ml, nenhuma das lenhinas analisadas mostrou toxicidade em células não tumorais (PLP2).

A fim de realizar alguns estudos da relação estrutura/atividade, os valores de EC₅₀ obtidos nos ensaios de avaliação da atividade antioxidante e os valores de GI₅₀ obtidos nos ensaios de avaliação da atividade antitumoral foram correlacionadas com a composição química das lenhinas, ou seja, o total de OH, OH alifáticos, OH fenólicos, 5-condensados, ácidos S-OH (seringilo), G-OH (guaiacilo), H-OH (ρ - hidroxifenilo) e grupos ácidos (**Tabelas 7 e 8**).

A inibição do crescimento da linha celular MCF-7 parece estar correlacionada com os grupos OH fenólicos ($y=-0,0056x+4,375$, $R^2=0,7064$), H-OH

($y=0,0018x+0,1096$, $R^2=0,8377$) e ácidos ($y=0,0015x+0,1866$, $R^2=0,9027$). Relativamente às restantes linhas celulares estudadas (HCT-15, HeLa e HepG2), os grupos que influenciam a sua atividade parecem ser os OH alifáticos, S-OH, H-OH e grupos ácidos. Para a linha celular HCT-15, as correlações são $y=0,0283x+0,0283$, $R^2=0,7343$; $y=-0,0219x+2,6577$, $R^2=0,5733$; $y=0,0094x-0,4135$, $R^2=0,9799$ e $y=0,0073x-0,2011$, $R^2=0,9264$ para os grupos OH alifáticos, S-OH, H-OH e grupos ácidos, respetivamente. No que concerne à linha celular HeLa, verificam-se as seguintes correlações para o grupo OH alifático $y=0,0182x+1,3808$, $R^2=0,6507$; S-OH $y=-0,0152x+1,6848$, $R^2=0,5986$; H-OH $y=0,0063x+0,0233$, $R^2=0,933$ e grupos ácidos $y=0,0048x+0,1361$, $R^2=0,8776$. A linha celular HepG2 apresenta as seguintes correlações $y=0,0464x-0,6405$, $R^2=0,9284$; $y=-0,035x+3,1152$, $R^2=6,897$; $y=0,0131x-0,4788$, $R^2=0,8921$ e $y=0,0098x-0,2315$, $R^2=0,7947$ para OH alifáticos, S-OH, H-OH e grupos ácidos, respetivamente.

Finalmente, para as correlações obtidas nos ensaios da atividade antioxidante, a atividade captadora de radicais DPPH parece estar correlacionada com S-OH ($y=-0,016x+1,3736$, $R^2=0,6581$) e G-OH ($y=0,0017x+0,7521$, $R^2=0,6184$), enquanto que o poder redutor parece estar mais relacionado com OH alifáticos ($y=-0,0016x+3,3592$; $R^2 = 0,709$).

Quanto a inibição da descoloração do β -caroteno, mostrou correlação com os S-OH ($y=-0,0043x+1,3166$, $R^2=0,5257$).

Tabela 7 - Correlações entre a composição química das lenhinas estudadas e os valores de GI₅₀ obtidos nos ensaios de avaliação da atividade antitumoral.

	Total OH	OH alifáticos	OH fenólicos	S-OH	G-OH	H-OH	5-condensado	Grupos ácidos
MCF-7 (Carcinoma da mama)	$y = -0,002x + 6,2655$ $R^2 = 0,0661$	$y = 0,0036x + 1,8905$ $R^2 = 0,2816$	$y = -0,0056x + 4,375$ $R^2 = 0,7064$	$y = -0,025x + 1,171$ $R^2 = 0,1767$	$y = -0,0004x + 1,4555$ $R^2 = 0,003$	$y = 0,0018x + 0,1096$ $R^2 = 0,8377$	$y = -0,0022x + 1,5917$ $R^2 = 0,3135$	$y = 0,0015x + 0,1866$ $R^2 = 0,9027$
HCT15 (Carcinoma do colón)	$y = 0,0075x + 5,2783$ $R^2 = 0,0376$	$y = 0,0283x + 0,0283$ $R^2 = 0,7343$	$y = -0,0208x + 5,25$ $R^2 = 0,4032$	$y = 0,0219x + 2,6577$ $R^2 = 0,5733$	$y = 0,0096x + 0,5651$ $R^2 = 0,0932$	$y = 0,0094x - 0,4135$ $R^2 = 0,9799$	$y = -0,005x + 1,6541$ $R^2 = 0,0647$	$y = 0,0073x - 0,2011$ $R^2 = 0,9264$
HeLa (Carcinoma cervical)	$y = 0,0051x + 5,6238$ $R^2 = 0,0366$	$y = 0,0182x + 1,3808$ $R^2 = 0,6507$	$y = -0,0131x + 4,243$ $R^2 = 0,345$	$y = -0,0152x + 1,6848$ $R^2 = 0,5986$	$y = 0,0077x + 0,9313$ $R^2 = 0,1288$	$y = 0,0063x + 0,0233$ $R^2 = 0,933$	$y = -0,0026x + 1,3817$ $R^2 = 0,038$	$y = 0,0048x + 0,1361$ $R^2 = 0,8776$
HepG2 (Carcinoma hepatocelular)	$y = 0,0221x + 4,4414$ $R^2 = 0,1531$	$y = 0,0464x - 0,6405$ $R^2 = 0,9284$	$y = -0,0242x + 5,082$ $R^2 = 0,2586$	$y = -0,035x - 3,1152$ $R^2 = 0,6897$	$y = 0,0187x + 0,1397$ $R^2 = 0,166$	$y = 0,0131x - 0,4788$ $R^2 = 0,8921$	$y = -0,0036x + 1,4669$ $R^2 = 0,016$	$y = 0,0098x - 0,2315$ $R^2 = 0,7947$

G- Guaiacilo; H - p-Hidroxifenilo; HCT15 – Carcinoma do colón; HeLa – Carcinoma cervical; HepG2 – Carcinoma hepatocelular; MCF-7 – Carcinoma da mama; NCI-H460 – Carcinoma do pulmão; S – Seringilo.

Tabela 8 - Correlações entre a composição química das lenhinas estudadas e os valores de EC₅₀ obtidos nos ensaios de avaliação da atividade antioxidante.

	Total OH	OH alifáticos	OH fenólicos	S-OH	G-OH	H-OH	5-condensado	Grupos ácidos
Atividade captadora de radicais DPPH	y=0,0013x+5,4357 R ² =0,2387	y=0,0011x+2,063 R ² =0,2345	y=0,0002x+ 3,3727 R ² =0,0082	y=- 0,0016x+1,3736 R ² =0,6581	y=0,0017x+0,752 1 R ² =0,6184	y=0,0003x+0,282 R ² =0,2361	y=0,0006x+0,99 3 R ² =0,2088	y=0,0002x+0,347 7 R ² =0,165
Poder redutor	y=-0,0011x+6,5223 R ² =0,2331	y=- 0,0016x+3,3592 R ² =0,709	y=0,0005x+ 3,1631 R ² =0,0769	y=0,0009x+0,27 54 R ² =0,2843	y=- 0,0004x+1,6113 R ² =0,0462	y=- 0,0003x+0,573 R ² =0,3222	y=9E- 05x+1,1732 R ² =0,0071	y=- 0,0002x+0,5489 R ² =0,2596
Inibição da peroxidação lipídica pelo ensaio β - caroteno/lin oleato	y=0,0023x+5,6319 R ² =0,0844	y=0,003x+2,1035 R ² =0,1857	y=- 0,0006x+3, 528 R ² =0,0082	y=- 0,0043x+1,3166 R ² =0,5257	y=0,0041x+0,872 5 R ² =0,3975	y=0,0011x+0,260 8 R ² =0,3168	y=0,0011x+1,08 82 R ² =0,0705	y=0,0008x+0,325 6 R ² =0,2612

DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo; G- Guaiacilo; H - *p*-Hidroxifenilo; S – Seringilo

V. Conclusão

Este trabalho visou o estudo da bioatividade da lenhina do ponto de vista teórico (realização de uma revisão bibliográfica sobre o tema) e experimental (avaliação *in vitro* da atividade antioxidante e antitumoral de amostras de lenhina selecionadas). No que concerne à revisão bibliográfica verificou-se que o estudo da bioatividade da lenhina incide principalmente sobre a avaliação da sua atividade antioxidante, sendo os estudos da atividade antitumoral mais escassos.

Para o estudo experimental foram selecionadas quatro lenhinas técnicas provenientes de diferentes origens botânicas e processos industriais (Indulin-AT, Curan-27-11P, Sarkanda e Alcell). As lenhinas Indulin-AT e Curan-27-11P (comercializada na forma alcalina) são lenhinas de resinosas obtidas pelo processo Kraft. A Sarkanda é uma lenhina não lenhosa obtida a partir de um processo de deslenhificação por processo de soda, patenteado pela Granit SA. A lenhina Alcell foi fornecida pela Repap Enterprises Inc. e foi extraída a partir de folhosas por um processo Organosolv usando uma mistura etanol-água.

Os resultados obtidos quanto à atividade antioxidante e antitumoral foram correlacionados com as características estruturais e químicas das lenhinas estudadas. Neste contexto, a Alcell, lenhina extraída a partir de uma mistura de folhosas por um processo Organosolv usando uma mistura etanol-água, mostrou uma maior atividade antioxidante e antitumoral. Estes resultados podem ser correlacionados com o seu tipo de estrutura guaiacilo-siringilo (GS) e o seu elevado conteúdo de grupos hidroxilo. Este tipo de lenhinas GS possui a particularidade de ser rico em unidades fenólicas de siringilo e pobres em unidades fenólicas de *p*-hidroxifenilo.

Os resultados obtidos, que indicam potencial antitumoral da lenhina, motivam a realização de estudos adicionais com outras lenhinas ou frações destas, nomeadamente frações de massa molecular baixa. Adicionalmente o estudo de lenhinas provenientes de novos processos, com potencial para gerar lenhinas mais puras, é também um ponto de interesse para estudos futuros.

VI. Bibliografia

- Aadil, K.R., Barapatre, A., Sahu, S., Jha, H., Tiwary, B.N. 2014. Free radical scavenging activity and reducing power of *Acacia nilotica*. *International Journal of Biological Macromolecules*. 67, 220-227.
- Abreu, R. M. V., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Lima. R. T., Vasconcelos, M. H., Adegas, F., Chaves, R., Queiroz, M. J. R. P. 2011. Anti-hepatocellular carcinoma activity using human HepG2 cells and hepatotoxicity of 6-substituted methyl 3-aminothienopyridine-2-carboxylate derivatives: In vitro evaluation, cell cycle analysis and QSAR Studies. *European Journal of Medicinal Chemistry*. 46. 5800-5806.
- Adler, E. 1977. Lignin chemistry-past, present and future. *Wood Science and Technology*. 11. 169-218.
- Alves. A. M. 2010. Caracterização do Teor e Composição Estrutural da Lenhina por Espectroscopia de Infravermelho Próximo e Pirólise Analítica. Dissertação de Tese - Universidade Técnica de Lisboa.
- Amarowicz, R., Pegg, R. B., Rahimi – Moghaddam, P., Barl, B., Weil, J. A. 2004. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. *Food Chemistry*. 84. 551 – 562.
- Bakiri, L., Wagner, E. F. 2013. Mouse models for liver cancer. *Molecular oncology*. 7. 206-223.
- Berker, K.I., Güçlü, K., Tor, I., Apak, R. 2007. Comparative evaluation of Fe(III) reducing power-based antioxidant capacity assays in the presence of phenanthroline, batho-phenanthroline, tripyridyltriazine (FRAP), and ferricyanide reagents. *Talanta*, 72, 1157-1165.

- Block, T. M., Mehta, A. S., Fimmel, C. J., Jordan, R. 2003. Molecular viral oncology of hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. 22. 5093-5107.
- Burda, S., Oleszek, W. 2001. Antioxidant and antiradical activity of flavonoids. *Journal of Agricultural*. 49. 2774 – 2779.
- Carocho, M., Barreiro, M. F., Morales, P., Ferreira, I. C. F. R. 2014. Adding molecules to food, pros and cons: a review on synthetic and natural food additives. *Comprehensive review In Food Science and Food Safety*. 13. 377-399.
- 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.
- Cateto, C. A. 2008. Lignin-Based Polyurethanes: Characterisation, Synthesis and Applications. Tese de dissertação para o grau de doutorada. Universidade do Porto – Faculdade de Engenharia.
- Cateto, C. A., Barreiro, M. F. Rodrigues, A. E., Brochier-Salon, M. C., Thielemans, W., Naceur Belgacem, M. 2008. Lignins as Macromonomers for Polyurethane Synthesis: A Comparative Study on Hydroxyl Group Determination. *Journal of Applied Polymer Science*. 109. 3008-3017.
- Chen, J. G., Zhang, S. W. 2011. Liver cancer epidemic in China: Past, present and future. *Seminars in cancer biology*. 21. 59-60.
- Chowdhury, M. A. 2014. The controlled release of bioactive compounds from lignin and lignin-based biopolymer matrices. *International journal of biological macromolecules*. 65. 136-147.
- Conte, V. P. 2000. Carcinoma hepatocellular. Parte 1. Considerações gerias e diagnostic. *Arquivos de Gastroenterologia*. 37. 58-68.

- Cooper, G. M., 2000. The cell: A molecular Approach. Sinauer Associates,. Sinderland (MA).
- Cotana, F., Cavalaglio, G., Nicolini, A., Gelosia, M., Coccia, V., Petrozzi, A., Brinchi, L. 2014. Lignin as Co-product of Second Generation Bioethanol Production from Ligno-cellulosic Biomass. Energy Procedia. 45. 52-60.
- Cruz, R., Dopico, D., Figueredo, J., Rodriguez, M., Martinez, G. 1997. Uso de la Lignina de Bagazo con fines Medicinales. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 14. 67-71.
- Cunha, A. P. 2005. Farmacognosia e Fitoquímica. Fundal Colauste. Gulbenkian.
- Dizhbite, T., Telysheva, G., Jurkjane, V., Viesturs, U. 2004. Characterization of the radical scavenging activity of lignin-natural antioxidants. Bioresource Technology. 95, 309-317.
- Doherty, W. O., Mousavioun, P., Fellows, C. M. 2011. Value-adding to cellulosic ethanol: Lignin polymers. Industrial Crops and products. 33, 259-276.
- Dong, X., Dong, M., Lu, Y., Turley, A., Jin, T., Wu, C. 2011. Antimicrobial and antioxidant activities of lignins from residue of corn stover to ethanol production. Industrial Crops and Products. 34, 1629-1634.
- Erakovic, S., Veljovic, D., Diuof, P.N., Stevanovic, T., Mitic, M., Janackovic, D., Matic, I.Z., Juravic, Z.D., Miskovic-Stankovic, V. 2012. The effect of lignin on the structure and characteristics of composite coating electrodeposited on titanium. Progress in Organic Coating. 75, 275-283.
- Esakkirajan, M., Prabhu, N. M., Arulvasu, C., Beulaja, M., Manikandan, R., Thiagarajan, R., Govindaraju, K., Prabhu, D., Dinesh, D., Babu, G., Dhanasekaran, G. 2014. Anti-proliferative effect of a compound isolated from *Cassia auriculata* against human colon cancer cell line HCT 15, Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 120, 462-466.

- Faustino, H., Gil, N., Baptista, C., Duarte, A. P. 2010. Antioxidant Activity of Lignin Phenolic Compounds Extracted from Kraft and Sulphite Black Liquors. *Journal Molecules*. 15. 9308-9322.
- Ferreira, I. C. F. R., Abreu, R. M. V. 2007. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos. *Bioanálise*. 2. 32-37.
- Ferreira, I. C. F. R., Barros, L., Abreu, R. M. V. 2009. Antioxidant in Wild Mushroomsm. *Current Medicinal Chemistry*. 16. 1543-1560.
- García, A., Alriols, M.G., Spigno, G., Labidi, J. 2012. Lignin as natural radical scavenger. Effect of the obtaining and purification process on the antioxidant behavior of lignin. *Biochemical Engineering Journal*. 67, 173-185.
- García, A., Toledano, A., Andrés, M.A., Libidi, J. 2010, Study of the antioxidant capacity of *Miscanthus sinensis* lignins. *Process Biochemistry*. 45, 935-940.
- Ghaffar, H. S., Fan M. 2014. Lignin in straw and its applications as an adhesive. *International Journal of Adhesion & Adhesives*. 48. 92-101.
- Gouveia, S. C., Castilho, P. C. 2012. Phenolic composition and antioxidant capacity of cultivated artichoke, Madeira cardoon and artichoke – based dietary supplements. *Food Research International*. 48. 712 – 724.
- Guimarães, R., Barros, L., Dueñas, M., Calhella, R. C., Carvalho, A. M., Buelga, C. S., Queiroz, M. J. R. P., Ferreira, I. C. F. R. 2013. Nutrients, phytochemicals and bioactivity of wild *Roman Chamomile*: A comparison between the herb and its preparations. *Food Chemistry*. 136. 718-725.
- Hage, R. E., Brosse, N., Sannigrahi, P., Ragauskas, A. 2010. Effects of process severity on the chemical structure of *Miscanthus* ethanol organosolv lignin. Polymer degradation and strability. 95. 997-1003.

- Hartung, T., Balls, M., Bardouille, C., Blanck, O., Coeke, S., Gastraunthaler, G., Lewis, D. 2002. ECVAM good cell practice Task Force Report 1. Good cell culture practice. 30. 407-414.
- Heleno, S. A., Ferreira, I. C. F. R., Calhelha, R. C., Esteves, A. P., Martins, A., Queiroz, M. J. R. P. 2014. Cytotoxicity of *Coprinopsis atramentaria* extract, organic acids and their synthesized methylated and glucuronate derivatives. Food Research International. 55. 170-175.
- HogenEsch, H., Nikitin, A. Y. 2012. Challenges in pre-clinical testing of anti-cancer drugs in cell culture and in animal models. Journal of controlled release. 164. 183-186.
- Hussin, M. H., Rahim, A. A., Ibrahim, M. N. M., Yemloul, M., Perrin, D., Brosse, N. 2014. Investigation on the structure and antioxidant properties of modified lignin obtained by different combinative processes of oil palm fronds (OPF) biomass. Industrial crops and products. 52. 544-551.
- Ibrahim, B., Sowemimo, A., Spies, L., Koekomoos, T., Venter, M., Odukoya, O.A. 2013. Antiproliferative and apoptosis inducing activity of *Markhamia tomentosa* leaf extract on HeLa cells. Journal of Ethnopharmacology. 149. 745-749.
- International Lignin Institute - ILI. About Lignin. <http://www.ili-lignin.com/index.php> (accessed 2014).
- Karadag, A., Ozceliz, B., Saner, S. 2009. Review of methods to determine antioxidant capacities. Food Analytical Methods. 2. 41 – 60.
- Karavalakis, G., Stournas, S., 2010. Impact of antioxidant additives on the oxidation stability of diesel/biodiesel blends. Energy Fuels. 24. 3682-3686.
- Kim, J., Hwang, H., Oh, S., Kim, Y., Kim, U., Choi, J. W. 2014. Investigation of structural modification and thermal characteristics of lignin after heat treatment. International journal of biological macromolecules. 66. 57-65.

- Kosikova, B., Slamenova, D., Mikulasava, M., Horvathova, E., Labaj, J. 2002. Reduction of carcinogenesis by bio-based lignin derivatives. *Biomass and Bioenergy*. 23, 153-159.
- Lehninger, A. L., Nelson, D. L., Cox, M. M. 2008. *Principals of Biochemistry*. W. M., Feeman, 5th Editon.
- Li, M.F., Sun, S.N., Xu, F., Sun, R.C. 2012. Microwave-assisted organic acid extraction of lignin from bamboo: Structure and antioxidant activity investigation. *Food Chemistry*. 134, 1392-1398.
- Lin, S. Y. 1992. Ultraviolet spectrophotometry. In: *Methods in Lignin Chemistry*.
- Lo, Y. L., Wang, W. 2013. Formononetin potentiates epirubicin-induced apoptosis via ROS production in HeLa cells in vitro. *Chemico-Biological Interactions*. 205. 188-197.
- Lobo, V., Pantak, A., Chandra, N. 2010. Free radicals and functional foods: impact on human health. *Pharmacognosy review*. 4. 118-126.
- López, B. S. G., Yamamoto, M. Sakagami, H. 2012. Treatment of Herpes Simplex Virus with Lignin-Carbohydrate Complex Tablet, an Alternative Therapeutic Formula. editado por Dr. Patrick Arbuthnot. publicado por InTech.
- Lora, J., 2008. Industrial commercial lignins: Sources, properties and applications. In: *Monomers, polymers and composites from renewable resources*. Belgacem, N.M. Gandini, A., (Eds). Elsevier publications, 225-241.
- Lu, F.J., Chu, L.H. Gau, R.J. 1998. Free radical – scavenging properties of lignin. *Nutrition and Cancer*. 30, 31-38.

- Lu, Q., Liu, W., Yang, L., Zui, Y., Zu, B., Zhu, M., Zhang, Y., Zhang, X., Zhang, R., Sun, Z., Huang, J., Zhang, X., Li, W. 2012. Investigation of the effects of different organosolv pulping methods on antioxidant capacity and extraction efficiency of lignin. *Food Chemistry*. 131, 313-317.
- Lu, Q., Zhu, M., Zu, Y., Liu, W., Yang, L., Zhang, Y., Zhao, X., Zhang, X., Zhang, Li, W. 2012a. Comparative antioxidant activity of nanoscale lignin prepared by a supercritical antisolvent (SAS) process with non-nanoscale lignin. *Food Chemistry*. 135, 63-67.
- Mansouri, N., Salvadó, J. 2004. *Técnicas de Caracterización de Lignina. Aplicación a Ligninas Técnicas de 5 Origenes Distintos*. Departament d'Enginyeria Química, Universitat Rovira i Virgili. trabalho apresentado no III Congresso Ibero Americano de Investigação em Celulose e Papel.
- Marabito, A., Carillio, G., Daniele, G., Piccirillo, M. C., Montanino, A., Costanzo, R., Sandomenico, C., Pasqualina, G., Normanno, N., Perrone, F., Rocco, G., Di Maio, M. 2014. Treatment of small cell lung cancer. *Oncology hematology*. 1847. 1-14.
- McCarthy, J. L., Islam, A. 2000. Lignin Chemistry, Technology, and Utilization: A Brief History. In W. e. Glasser, *Lignin: Historical, Biological, and Materials Perspectives*. Washington, DC: American Chemical Society. 2-99.
- Minegishi, Y., Kokuho, N., Miura, Y., Miyanaga, A., Noro, R., Saito, Y., seike, M., Kubota, K., Azuma, A., Kida, K. 2014. Clinical features, ante-cancer treatments and outcomes of lung cancer patients with combined pulmonary fibrosis and emphysema. *Lung Cancer*. 85. 258-263.
- Mohankumar, K., Pajariradje, S., Sridharan, S., Singh, V. K., Ronsard, L., Banerjea, A.C., Benson, C.S., Coumar, M. S., Rajagopalan, R. 2014. Mechanism of apoptotic induction in human breast cancer cell, MCF-7, by an analog of curcumin in comparison with curcumin – An in vitro and in silico approach. *Chemico-Biological Interactions*. 210. 51-63.

- Naik, P., Rozman, H.D., Bhat, R. 2013. Genoprotective effects of lignin isolated from oil palm black liquor waste. *Environmental Toxicology and Pharmacology*. 36, 135-141.
- Nsimba, R.Y., West, N., Boateng, A.A. 2012. Structure and radical scavenging activity relationship of pyrolytic lignins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 60, 12525-12530.
- Pan, X., Kadla, J.F., Ehara, K., Gilkes, N., Sadler, J.N. 2006. Organosolv ethanol lignin from hybrid poplar as a radical scavenger: relationship between lignin structure, extraction conditions, and antioxidant activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54, 5806-5813.
- Pereira, C. 2011. Caracterização nutricional e propriedades bioativas de espécies silvestres da etnoflora transmontana tradicionalmente consumidas em verde. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar.
- Pereira, E. 2011a. Contribuição para a inventariação química e nutricional de cogumelos do Nordeste de Portugal. Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar.
- Pinela, J. 2012. Efeito do processo de secagem no potencial antioxidante e na composição fitoquímica de plantas medicinais da família Fabaceae.
- Pinto, J. F. 2010. Nutracêuticos e alimentos funcionais. Lidel – edições técnicas, lda, Lisboa – Porto.
- Ponnala, S., Chaudhary, S., Sarrias, A. G., Seeram, N. P., Harding, W. W. 2012. Cytotoxicity of aporphines in human colon cancer cell lines HCT-116 and Caco-2: An SAR study. *Biorganic and Medicinal Chemistry Letters*. 21. 4462-4464.

- Pouteau, C., Dole, P., Cathala, B., Averous, L., Boquillon, N. 2003. Antioxidant properties of lignin in polypropylene. *Polymer Degradation and Stability*. 81. 9-18.
- Prior, R. L., Wu, X. L., Schaich, K. 2005. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of Agriculture and food chemistry*. 53. 4290 – 4302.
- Ralph, J. 2010. Hydroxycinnamates in lignification. *Phytochem Rev*. 9. 65-83.
- Rao, A. V., Rao, L. G. 2007. Carotenoids and human health. *Pharmacological Research*. 55. 207 – 216.
- Remédios, M. C. 2010. Lenhina e o seu contributo na Área Alimentar. Dissertação de Grau de Mestre - Departamento Grupo de Disciplinas de Ecologia da Hidrosfera - Universidade Nova de Lisboa.
- Rodrigues, S., Calheta, R. C., Barreira, J. C. M., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Abreu, R. M. V., Buelga, C. S., Ferreira, I. C. F. R. 2012. *Crataegus monogyna* buds and fruits phenolic extracts: Growth inhibitory activity human tumor cell lines and chemical characterization by HPLC-DAD-ESI/MS. *Food Research International*. 49. 516-523.
- Ryan, J. A. 2008. Introduction to animal cell culture: Technical bulletin. CORNING.
- Sahoo, S., Seydibeyoğlu, M. Ö., Mohanty, A. K., Misra, M. 2011. Characterization of industrial lignins for their utilization in future value added applications. *Biomass and bioenergy*. 35. 4230-4237.
- Sakagami, H., Ikeda, M., Unten, S., Takeda, K., Murayama, J.I., Hamada, A., Kimura, K., Komatsu, N., Konaa, K. 1987. Antitumor activity of polysaccharide fractions from Pine cone extract of *Pinus parviflora* Sieb. et Zucc. *Anticancer Research*. 7, 1153-1160.

- Sakagami, H., Kashimata, M., Toguchi, M., Satoh, K., Odanaka, Y., Ida, Y., Premanathan, M., Arakaki, R., Kathiresan, K., Nakashima, H., Komatsu, N., Fujimaki, M., Yoshihara, M. 1998. Radical modulation activity of lignins from a Mangrove Plant, *Ceriops decantra* (Griff.) Ding Hou. *In vivo*. 12, 327-332.
- Sakagami, H., Kawazoe, Y., Komatsu, N., Simpson, A., Nonoyama, M., Konno, K., Yoshida, T., Kuroiwa, Y., Tanuma, S. 1991. Antitumor, antiviral and immunopotentiating activities of Pine cone extracts: Potencial medicinal efficacy of natural and synthetic lignin-related materials (review). *Anticancer Research*. 11, 881-888.
- Sakagami, H., Kushida, T., Oizumi, T., Nakashima, H., Makino, T. 2010. Distribution of Lignin-Carbohydrate Complex in Plant Kingdom and its Functionality as Alternative Medicine, *Pharmacology and Therapeutics*, 128, 91-105.
- Sakagami, H., Satooh, K., Ida, Y., Koyama, N., Premanathan, M., Arakaki, R., Nakashima, H., Hatano, T., Okuda, T., Yoshida, T. 1999. Induction of apoptosis and anti-HIV activity by tannin-and lignin-related substances. *Plant Polyphenols 2: Chemistry, Biology, Pharmacology, Ecology*. Edited by Gros *et al.* Kluwer Academic/Plenum Publishers. New York.
- Santos, A. Q., Bobermin, L. D., Tramontina, A. C., Wartchow, K. M., Tagliari, B., Souza, D. O., Wyse, A. T. S., Gonçalves, C. A. 2014. Oxidative stress mediated by NMDA, AMPA/KA channels in acute hippocampal slices: Neuroprotective effect of resveratrol. *Toxicology in vitro*. 28. 544-551.
- Sarkanen, K.V., Ludwig, C.H., 1971. Lignins: Occurrence, Formation, Structure and Reactions, Wiley, New York.
- Sasco, A. J., Secretan, M. B., Straif, K. 2004. Tobacco smoking and cancer: a brief review of recent epidemiological evidence. *Lung cancer*. 45. 53-59.

- Satoh, K., Anzai, S., Sakagami, H. 1998. Enhancement of radical intensity and cytotoxic activity of Ascorbate by *Crataegus cuneata* Sieb et. Zucc. Extracts. *Anticancer research*. 18, 2749-2754.
- Satoh, K., Anzai, S., Sakagami, H. 1998a. Radical scavenging activity of *Acer nikoense* Maxim. Extract. *Anticancer Research*. 18, 833-838.
- Schlegel, H. G. 1993. *General microbiology*. 7th ed. Cambridge University Press.
- Senkus, E., Cardoso, F., Pagani, O. 2014. Time for more optimism in metastatic breast cancer?. *Cancer Treatment Reviews*. 40. 220-228.
- SIGMA. 2008. *Fundamental techniques in cell culture*.
- Silva, E. A. B., Zabkova, M., Araújo, J. D., Cateto, C. A., Barreiro, M. F., Belgacem, M. N., Rodrigues, A. E. 2009. An integrated process to produce vanillin and lignin-based polyurethanes from Kraft lignin. *Chemical Engineering Research and Design*. 1276-129.
- Sun, S.L., Wen, J.L., Ma, M.G., Sun, R.C., Jones, G.L. 2014. Structural features and antioxidant activities of degraded lignins from steam exploded bamboo steam. *Industrial Crops and Products*. 56, 128-136.
- Thoma, C. R., Zimmermann, M., Agarkova, I., Kelm, J. M., Krek, W. 2014. 3D cell culture systems modeling tumor growth determinants in cancer target discovery. *Advanced drug delivery reviews*. 1-13.
- Toh, K., Yokoyama, H., Noda, H., Yuguchi, Y. 2010. Antioxidant capacity of lignin green tea waste. *Journal of Food Biochemistry*. 34, 192-206
- Uenojo, M., Maróstica, Jr. M. R., Pastore, G. M. 2007. Carotenóides: propriedades, aplicação e biotransformação para formação de compostos de aroma. *Química Nova*. 30. 616-622.

- Ugartondo, V., Mitjans, M., Vinardell, M.P. 2008. Comparative antioxidant and cytotoxic effects of lignins from different sources. *Bioresource Technology*. 99, 6683-6687.
- Ugartondo, V., Mitjans, M., Vinardell, M.P. 2009. Applicability of lignins from different sources as antioxidant based on the protective effects on lipid peroxidation induced by oxygen radicals. *Industrial Crops and Products*. 30, 184-187.
- Verma, S. R., Dwivedi, U. N. 2014. Lignin genetic engineering for improvement of wood quality: Applications in paper and textile industries, fodder and bioenergy production. *South African Journal of Botany*. 107-125.
- Vinardell, M.P., Ugartondo, V., Mitjans, M. 2008. Potential applications of antioxidant lignins from different sources. *Industrial Crops and Products*. 27, 220-223.
- Yamanaka, D., Motoi M., Ishibashi K., Miura N. N., Adachi Y., Ohno N. 2013. Modulation of Interferon- γ Synthesis by the Effects of Lignin-like Enzymatically Polymerized Polyphenols on Antigen-Presenting Cell Activation and the Subsequent Cell-to-cell. *Food Chemistry*. 141. 4073-4080.
- Yang, X. H., Zhang, P. H., Hu, L. H., Zhang, M., Liu, C. G., Liu, H. J., Zhou, Y. H. 2012. Synthesis and bioactivity evaluation of lignin related high-added-value 1,4-dihydropyridines and polyhydroacridines. *Industrial Crops and Products*. 38. 14-20.
- Yang, X. H., Zhang, P. H., Wang, Z. M., Jing, F., Zhou, Y. H., Hu, L. H. 2014. Synthesis and bioactivity of lignin related high-added-value 2H,4H-dihydro-pyrano[2,3-c]pyrazoles and 1H,4H-dihydro-pyrano[2,3-c]pyrazoles. *Industrial Crops and Products*. 52. 413-419.

Zhou, S., Liu, L., Wang, B., Xu, F., Sun, R. 2012. Microwave-enhanced extraction of lignin from birch in formic acid: Structural characterization and antioxidant activity study. *Process Biochemistry*. 47, 1799-1806.