



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR
Ciências

Pesquisa e Identificação de Compostos Bioativos em Plantas Florestais

Ângelo Filipe Santos Luís

Tese para obtenção do Grau de Doutor em
Bioquímica
(3º ciclo de estudos)

Orientadora: Prof.^a Doutora Fernanda da Conceição Domingues
Co-orientadora: Prof.^a Doutora Ana Paula Coelho Duarte

Covilhã, maio de 2014

Este trabalho foi financiado pela Bolsa de Doutoramento (Referência: SFRH/BD/65238/2009) concedida pela Fundação para a Ciência e a Tecnologia, cofinanciada pelo Fundo Social Europeu, no âmbito do Programa Operacional Potencial Humano do Quadro de Referência Estratégico Nacional, e por fundos nacionais do Ministério da Educação e Ciência.

FCT Fundação para a Ciência e a Tecnologia
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CIÊNCIA



GOVERNO DE
PORTUGAL



PROGRAMA OPERACIONAL POTENCIAL HUMANO



QUADRO
DE REFERÊNCIA
ESTRATÉGICO
NACIONAL
PORTUGAL 2007-2013



UNIÃO EUROPEIA
Fundo Social Europeu

Dedicatória

Dedico esta tese ao meu saudoso pai. Onde quer que ele esteja, estará muito feliz e orgulhoso pela conclusão desta etapa. A melhor herança que me deixou foi o seu exemplo de vida, os seus princípios e a sua integridade de carácter. Esta tese também é dele!

Agradecimentos

Começo por agradecer à Prof.^a Fernanda, por ter orientado este trabalho, por me ter inculido o seu espírito crítico e clareza de ideias. Agradeço-lhe pela sua amizade, pela compreensão nas alturas mais difíceis e acima de tudo pelo rigor científico com o qual sempre me acompanhou.

À Prof.^a Ana Paula Duarte, agradeço-lhe pela disponibilidade constante para o meu trabalho, pelo empenho na resolução dos problemas que foram surgindo, por me ter dado a liberdade de fazer escolhas e por ter confiado em mim desde o princípio.

Quero agradecer também à Fundação para a Ciência e a Tecnologia, que ajudou a materializar este objetivo através do financiamento deste trabalho, pela concessão da Bolsa de Doutoramento (Referência: SFRH/BD/65238/2009), e à Universidade da Beira Interior por todos estes anos de constante aprendizagem.

Agradeço de uma forma muito carinhosa a todas as pessoas do Grupo Papel da Unidade de Materiais Têxteis e Papeleiros, por me terem acolhido e integrado como um “Papeleiro”. Particularmente à Prof.^a Emília pela amizade e empatia que criámos e pela preocupação que sempre demonstrou pelo meu trabalho; à Prof.^a Ana Paula Costa pelo seu apurado sentido de humor e pelo carinho com que sempre me tratou; ao Prof. Rogério pelo companheirismo nas horas passadas no laboratório; à Eng.^a Cristina pelo incentivo que me deu no momento mais complicado da minha vida e pela grandiosa prova de amizade; aos restantes elementos (Prof.^a Ana Ramos, D.^a São, Carla e Nuno) pela companhia e generosidade que sempre tiveram. Nesta altura fica também uma palavra de reconhecimento à Sónia, não só pela grande amizade e pela partilha de gabinete e de ideias, mas também pela sua preciosa ajuda e aplicação dos seus valiosos conhecimentos na determinação dos Ângulos de Contacto nas minhas amostras.

O meu sincero obrigado à Prof.^a Ana Carreira pelo encorajamento que me deu!

Um agradecimento especial à Prof.^a Dalila Espírito-Santo e à Dr.^a Paula Paes que tão gentilmente me receberam no Herbário João de Carvalho e Vasconcellos (Instituto Superior de Agronomia/Jardim Botânico d’Ajuda) e prontamente se disponibilizaram a identificar e catalogar as amostras das plantas usadas neste trabalho. Ao Parque Natural da Serra da Estrela, ao Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade e ao Centro de Interpretação da Serra da Estrela (Município de Seia), a minha gratidão pelos esclarecimentos prestados, pelas autorizações concedidas e por toda a documentação que me facultaram.

Ao Eng. Rafael Chust (Tecnocroma) e ao Eng. Henrique Lebre (Cromolab) agradeço pelos conhecimentos que me transmitiram acerca do funcionamento do HPLC.

À Eng.^a Ana Paula Gomes, do Centro de Ótica, agradeço pelo prestável auxílio na preparação das amostras para Microscopia Eletrônica de Varrimento e na posterior aquisição das imagens.

Agradeço também a todos os membros do Centro de Investigação em Ciências da Saúde. De um modo muito especial à Susana, por tudo o que me ensinou, por ter sido um exemplo como investigadora e pela estima que me tem; à Prof.^a Luiza pelas horas dispensadas no laboratório nos ensaios de citotoxicidade e pela sua enorme dedicação ao meu trabalho; à Carla Cruz que acreditou que era possível identificar o composto presente nas frações, que tudo fez para alcançar esse objetivo e pela alavancagem que trouxe ao meu trabalho; à Filomena pela persistência nos ensaios de Citometria, pela qualidade do trabalho que me ajudou a desenvolver e pelos conhecimentos que me transmitiu.

À amiga Larissa, que veio de longe para um estágio, agradeço pela enorme paciência, dedicação e apoio que me deu.

Agradeço à Dr.^a Margarida Oliveira, e a toda a sua equipa, por estar sempre disponível para ouvir os meus queixumes e por me ajudar a ultrapassar as fases em que o meu dedo decidia lembrar-me que existia.

Às minhas amigas. À Andreia Oliveira, amiga de sempre, agradeço-lhe do fundo do coração por ter estado sempre presente e por ter sempre tempo para mim, apesar da distância que nos separa. À Andreia Duarte, a amiga que o doutoramento me deu e que é como minha irmã, agradeço-lhe pelo apoio incondicional, pela presença constante e permanente na minha vida, pela amizade inestimável, pelo estímulo a nível laboratorial e por me ter ensinado a ver as coisas de outra perspetiva. Com amizades assim, todos os obstáculos se superam!

A toda a minha família, principalmente aos mais velhos, ao avô Joaquim, à tia Graça e à avó Rosária, agradeço pelo amor que me têm, por acreditarem em mim, pelo constante incentivo e por se preocuparem tanto comigo.

Por fim, e não menos importante, agradeço à minha mãe por ser aquela pessoa com quem incansavelmente posso contar e por estar sempre do meu lado, mesmo quando o mundo parece desabar. Estaremos sempre unidos!

*“Mal nos conhecemos
Inaugurámos a palavra «amigo».
«Amigo» é um sorriso
De boca em boca,
Um olhar bem limpo,
Uma casa, mesmo modesta, que se oferece,
Um coração pronto a pulsar
Na nossa mão!
«Amigo» (recordam-se, vocês aí,
Escrupulosos detritos?)
«Amigo» é o contrário de inimigo!
«Amigo» é o erro corrigido,
Não o erro perseguido, explorado,
É a verdade partilhada, praticada.
«Amigo» é a solidão derrotada!
«Amigo» é uma grande tarefa,
Um trabalho sem fim,
Um espaço útil, um tempo fértil,
«Amigo» vai ser, é já uma grande festa!”*

Alexandre O'Neill

Resumo

A avaliação científica e experimental das propriedades das plantas, que os ancestrais utilizavam na medicina tradicional, conhece um grande desenvolvimento, nomeadamente na procura de novos compostos com propriedades antioxidantes e anti-microbianas. Os compostos com propriedades antioxidantes podem ser utilizados na medicina no tratamento de patologias, relacionadas com o stresse oxidativo, em alternativa à terapêutica habitual, ou pela indústria alimentar, na confeção de alimentos funcionais, ou como substitutos dos antioxidantes sintéticos. Os compostos anti-microbianos podem ser utilizados no tratamento de infeções por microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais e na indústria alimentar na conservação dos alimentos. A área florestal portuguesa ascende aos 3,3 milhões de hectares, o que representa cerca de 38% do território, sendo uma importante fonte de matéria-prima com potencial atividade biológica. De entre o conjunto de constituintes ativos das plantas, os fenóis e os flavonoides têm sido estudados quanto às suas propriedades antioxidantes e de sequestração de radicais livres, assim como na inibição da peroxidação lipídica. As propriedades anti-microbianas destes compostos têm sido referidas, pois estes exercem nas plantas ação protetora contra microrganismos patogénicos.

O objetivo geral deste trabalho foi melhorar o conhecimento sobre as atividades biológicas de extratos obtidos a partir de espécies vegetais existentes no ecossistema da Serra da Estrela (*Echinopartum ibericum*, *Pterospartum tridentatum*, *Juniperus communis*, *Ruscus aculeatus*, *Rubus ulmifolius*, *Hakea sericea*, *Cytisus multiflorus*, *Crataegus monogyna*, *Erica arborea*, *Ipomoea acuminata* e *Ailanthus altissima*), e de definir procedimentos para a sua extração e valorização como produtos naturais para uso terapêutico e/ou nutracêutico. Assim, com este trabalho pretendeu estudar-se as propriedades antioxidantes, anti-microbianas e citotóxicas de extratos das diversas partes aéreas (caules, folhas, flores e frutos) dos arbustos mencionados, e analisar o respetivo perfil fitoquímico, no que respeita a algumas classes de metabolitos secundários (fenóis, flavonoides, taninos e alcaloides).

O método do reagente de Folin-Ciocalteu foi utilizado para a determinação do teor de fenóis totais e os taninos foram precipitados, a partir destes, com polivinilpolipirrolidona (PVPP); um método colorimétrico com cloreto de alumínio foi usado para a determinação dos flavonoides, e o método do reagente de Dragendorff foi utilizado para a estimativa dos alcaloides totais. O teste do 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e o sistema β -caroteno/ácido linoleico foram utilizados para avaliar a atividade antioxidante dos extratos. A identificação dos compostos fenólicos presentes nos extratos foi efetuada por cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (RP-HPLC). A atividade anti-microbiana dos extratos metanólicos de *Hakea sericea* foi avaliada pelo método da difusão em disco e pela determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC). A atividade anti-biofilme foi avaliada através da quantificação da

biomassa total do biofilme utilizando o violeta de cristal, e pela avaliação da atividade metabólica do biofilme pelo método do 3'-{1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis (4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate (XTT) . A citotoxicidade foi avaliada por ensaios de hemólise e pelo teste do 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).

A maioria dos extratos dos arbustos estudados apresentou um teor elevado de compostos fenólicos, bem como, propriedades antioxidantes significativas, que são provavelmente devidas à existência dos compostos fenólicos nos extratos, dado que se observou uma correlação linear positiva entre o Índice de Atividade Antioxidante (AAI) e teor de fenóis totais dos extratos. O procedimento de RP-HPLC mostrou que os compostos mais comuns eram os ácidos ferúlico e elágico e a quercetina. Destaca-se que para as espécies *Echinopartum ibericum*, *Hakea sericea* e *Ipomoea acuminata*, não existem estudos fitoquímicos anteriores e não se conhecem utilizações destas plantas na medicina tradicional. No geral, os extratos das folhas têm maior concentração de compostos fenólicos do que as outras partes aéreas dos arbustos.

Resultados preliminares demonstraram as potenciais propriedades anti-microbianas da espécie *Hakea sericea*, que é um arbusto invasivo nas florestas Portuguesas. Neste trabalho foi avaliada a atividade anti-microbiana de extratos de *Hakea sericea* em várias espécies de microrganismos, incluindo a capacidade de inibição da formação de biofilmes. Adicionalmente foram avaliadas as propriedades citotóxicas destes extratos em células humanas. Para as bactérias Gram-positivas, os valores de MIC dos extratos metanólicos de *Hakea sericea* variaram entre 0.040 e 0.625mg/mL, enquanto para o extrato dos frutos se obtiveram os menores valores de MIC para várias espécies de microrganismos, nomeadamente, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* e estirpes clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina (MRSA). Os extratos dos caules e dos frutos (2.5mg/mL) erradicaram completamente os biofilmes das estirpes *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, SA 01/10 e MRSA 12/08. Relativamente à toxicidade destes extratos, para as folhas, não foi observada hemólise, e no caso dos caules e dos frutos, apenas se verificou hemólise para concentrações muito elevadas, o que sugere a baixa toxicidade destes extratos. O extrato dos frutos não apresentou nenhum efeito tóxico para as células NHDF (*Normal Human Dermal Fibroblasts*), no entanto, para as concentrações de 0,017 e 0.008mg/mL, este extrato diminuiu a viabilidade da linha de células cancerígenas MCF-7 (*human breast adenocarcinoma cells*) em 60%, como os resultados do teste do MTT comprovaram.

Após se ter verificado que o extrato metanólico bruto dos frutos de *Hakea sericea* apresentava significativa atividade biológica, procedeu-se ao seu fracionamento bioguiado, o que levou ao isolamento e identificação de um novo alquenilresorcinol, o ácido 9-(3,5-dihidroxi-4-metilfenil)nona-3-(Z)-enóico, composto aqui pela primeira vez descrito. A estrutura deste novo composto foi comprovada por espectroscopia de ressonância magnética

nuclear (NMR), de infravermelho (FTIR) e por espectroscopia de massa de alta resolução (HRMS). As propriedades antibacterianas do novo alquenilresorcinol foram estudadas pela determinação dos seus valores de MIC contra várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, utilizando o método da resazurina. O alquenilresorcinol isolado e identificado inibiu o crescimento das bactérias, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*, com valores de MIC de 0.31, 0.02 e 0.16mg/mL, respetivamente. Baixos valores de MIC foram também obtidos contra as estirpes de *Staphylococcus aureus* (0.005-0.16mg/mL), incluindo os isolados clínicos (SA 01/10 e SA 02/10) e as estirpes de MRSA.

Dado que foram identificados nos extratos das plantas estudadas, vários compostos fenólicos, nomeadamente os ácidos gálico, cafeico e clorogénico, e como este grupo de compostos possui diversas atividades biológicas, foram neste trabalho analisadas as suas potenciais propriedades anti-microbianas e anti-biofilme em estirpes de *Staphylococcus aureus*, bem como o seu mecanismo de ação. Concluiu-se que estes ácidos fenólicos têm propriedades antiestafilocócicas, por exemplo, o ácido gálico influenciou as propriedades de adesão das células de *Staphylococcus aureus*. A produção de α -hemolisinas por estes microrganismos também foi inibida pelos ácidos gálico e cafeico. Em relação ao seu mecanismo de ação, o ácido cafeico interfere na estabilidade da membrana e com a atividade metabólica das células de *Staphylococcus aureus*.

Em suma, este trabalho, contribuiu para o melhor conhecimento das propriedades biológicas de diversas espécies vegetais, valorizando algumas para as quais não é conhecida nenhuma aplicação na medicina tradicional, nomeadamente *Echinopartum ibericum*, *Ailanthus altissima*, *Hakea sericea*. Por outro lado, permitiu isolar de uma espécie invasora, um novo alquenilresorcinol com propriedades anti-microbianas, permitindo deste modo contribuir para a valorização da biomassa florestal e para a descoberta de um potencial novo antibiótico.

Palavras-chave

Compostos fenólicos, atividade antioxidante, atividade anti-microbiana, biofilmes, *Ailanthus altissima*, *Hakea sericea*, ácido 9-(3,5-dihidroxi-4-metilfenil)nona-3-(Z)-enóico

Abstract

Fueled by the search for new compounds with antioxidant and antimicrobial activities, the scientific and experimental evaluation of the properties of plant already used by our ancestors in traditional medicine, as seen a great development in recent years. Such compounds can be used as an alternative or together with more traditional therapies to treat oxidative stress related pathologies or in the food industry, for the production of functional foods, or as a substitute for synthetic antioxidants. The antimicrobial compounds can be used to treat infections by microorganisms resistant to conventional antibiotics, or they can be used in the food industry, for food preservation. The Portuguese forest area amounts to 3.3 million hectares, which represents about 38% of the territory, and can be seen as an important source of raw material with potential biological activity. Among the set of possible active plant constituents, phenols and flavonoids have been studied due to their antioxidant properties and ability to sequester free radicals as well as for the inhibition of lipid peroxidation. In addition it is known that these compounds exert in plants a protective action against pathogenic microorganisms, thus indicating potential antimicrobial properties.

The aim of this work was to improve the knowledge on the biological properties of plant extracts obtained from naturally occurring species in the *Serra da Estrela* ecosystem (*Echinopartum ibericum*, *Pterospartum tridentatum*, *Juniperus communis*, *Ruscus aculeatus*, *Rubus ulmifolius*, *Hakea sericea*, *Cytisus multiflorus*, *Crataegus monogyna*, *Erica arborea*, *Ipomoea acuminata* and *Ailanthus altissima*), and to define procedures for their extraction and recovery as natural products for therapeutic and/or nutraceutical use. This work focused then on studying the antioxidant, antimicrobial and cytotoxic properties of the extracts of various aerial parts (stems, leaves, flowers and fruits) of the mentioned shrubs, and to analyze their phytochemical profile, with respect to some classes of secondary metabolites (phenols, flavonoids, tannins and alkaloids).

The method of Folin-Ciocalteu was used to determine the total phenols, and tannins were precipitated from these with polyvinylpyrrolidone (PVPP). A colorimetric method with aluminum chloride was used for the determination of flavonoids and the Dragendorff's reagent method was used for the estimation of total alkaloids. The 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) method and β -carotene bleaching test were used to evaluate the antioxidant activity of the extracts. The identification of phenolic compounds present in the extracts was performed by reversed-phase-high performance liquid chromatography (RP-HPLC). The antimicrobial activity of methanolic extracts of *Hakea sericea* was evaluated by the disk diffusion method and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined. The anti-biofilm activity was evaluated by measuring the total biomass of biofilms using the crystal violet assay, and the metabolic activity of the biofilm was assessed by the method of 3'-[1-

[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis (4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate (XTT). Cytotoxicity was assessed by hemolysis assays and by the test of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT).

Most of the studied shrubs extracts showed a high content of phenolic compounds, as well as significant antioxidant properties. Since a positive linear correlation between the Antioxidant Activity Index (AAI) and the total phenolic content of the extracts was observed, antioxidant properties are probably due to the presence of phenolic compounds in the extracts. The procedure of RP-HPLC showed that the most common compounds were ferulic and ellagic acids and quercetin. It is noteworthy that for the species *Echinopartum ibericum*, *Hakea sericea* and *Ipomoea acuminata*, there were no previous phytochemical studies and no known uses of these plants in traditional medicine. Overall, the extracts of the leaves had higher concentrations of phenolic compounds than other aerial parts of the shrubs.

Preliminary results demonstrated the potential antimicrobial properties of *Hakea sericea*, which is an invasive shrub in Portuguese forests. In this study the antimicrobial activity of *Hakea sericea* extracts was evaluated against various species of microorganisms, including the ability to inhibit the formation of biofilms. In addition the cytotoxic properties of these extracts were evaluated in human cells. For Gram-positive bacteria, MIC values of *Hakea sericea* methanolic extracts ranged between 0.040 and 0.625mg/mL, whereas fruit extract showed the lowest MIC values for various species of microorganisms, including *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes* and clinical methicillin-resistant strains of *Staphylococcus aureus* (MRSA). The stems and fruits extracts (2.5mg/mL) completely eradicated *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, SA 01/10 and MRSA 12/08 biofilms. Regarding the toxicity of these extracts, for the leaves, no hemolysis was observed and in the case of stems and fruits, hemolysis was observed only at very high concentrations, suggesting the low toxicity of these extracts. The fruits extract did not show any toxic effect for NHDF cells (Normal Human Dermal Fibroblasts), however, for concentrations of 0.017 and 0.008mg/mL, it reduced the viability of cancer cell line MCF-7 (human breast adenocarcinoma cells) by 60%, as the results of the MTT assay confirmed.

Having noted that the crude methanolic extract of *Hakea sericea* fruits showed significant biological activity, we proceeded to its bioassay-guided fractionation, which led to the isolation and identification of a new alkenylresorcinol, the 9-(3,5-dihydroxy-4-methylphenyl)nona-3(Z)-enoic acid, compound described here for the first time. The structure of this novel compound was confirmed by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR), infrared spectroscopy (FTIR) and high resolution mass spectroscopy (HRMS). The antibacterial properties of the new alkenylresorcinol were studied, determining their MIC values against various Gram-positive and Gram-negative bacteria, using the method of resazurin. This alkenylresorcinol inhibited the growth of bacteria, namely, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus*, with MIC values of 0.31, 0.02 and 0.16mg/mL, respectively. Low MIC values were also obtained against strains of

Staphylococcus aureus (0.005-0.16mg/mL) including clinical isolates (SA 01/10 and SA 02/10) and MRSA strains.

Since several phenolic compounds, including gallic, caffeic and chlorogenic acids have been identified in the plant extracts studied in this work, and as this group of compounds have diverse biological activities, their potential antimicrobial and anti-biofilm properties against *Staphylococcus aureus* strains, as well as, their mechanism of action were analyzed. It was concluded that these phenolic acids have antistaphylococcal properties, for instance, gallic acid influences the adhesion properties of *Staphylococcus aureus* cells. The α -hemolysin production by these microorganisms was also inhibited by gallic and caffeic acids. Regarding its mechanism of action, caffeic acid interferes with membrane stability and metabolic activity of *Staphylococcus aureus* cells.

In sum, this work has contributed to a better understanding of the biological properties of several plant species, giving value to some for which there was no known application in traditional medicine, including *Echinopartum ibericum*, *Ailanthus altissima* and *Hakea sericea*. In addition, it made possible to isolate from an invasive species, a new alkenylresorcinol with antimicrobial properties. Thereby raising interest in further studies of forest biomass and allowing the discovery of a potentially new antibiotic.

Keywords

Phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity, biofilms, *Ailanthus altissima*, *Hakea sericea*, 9-(3,5-dihydroxy-4-methylphenyl)nona-3(Z)-enoic acid

Índice

Capítulo 1 - Introdução Geral	1
1.1. Introdução	3
1.2. Compostos bioativos	4
1.2.1. Definição de compostos bioativos	4
1.2.2. Funções dos compostos bioativos nas plantas	4
1.2.3. Classificação e biossíntese de compostos bioativos	5
1.2.4. Extração de compostos bioativos	7
1.2.5. Métodos de determinação de compostos bioativos	9
1.2.5.1. Determinação de fenóis, polifenóis e taninos	9
1.2.5.2. Determinação de flavonoides	10
1.2.5.3. Determinação de alcaloides	11
1.3. Atividade antioxidante	12
1.3.1. Radicais livres no corpo humano	12
1.3.1.1. Peroxidação lipídica	14
1.3.1.2. Oxidação de hidratos de carbono	14
1.3.1.3. Oxidação de DNA	14
1.3.1.4. Oxidação de proteínas	15
1.3.2. Oxidação de produtos alimentares	15
1.3.3. Compostos naturais como antioxidantes	15
1.3.4. Métodos de determinação da atividade antioxidante	20
1.3.4.1. Método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)	20
1.3.4.2. Sistema β -caroteno/ácido linoleico	21
1.4. Atividade anti-microbiana	22
1.4.1. Resistência aos antibióticos	22
1.4.2. Biofilmes	23
1.4.2.1. Formação de biofilmes	24
1.4.2.2. Mecanismos de resistência do biofilme	26
1.4.3. Compostos naturais como anti-microbianos	27
1.4.4. Métodos de avaliação <i>in vitro</i> da atividade anti-microbiana	28
1.4.4.1. Teste da difusão em disco	29
1.4.4.2. Métodos para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)	29
1.4.4.3. Métodos de avaliação da atividade anti-biofilme	30
1.5. Caracterização das plantas estudadas	31
1.5.1. <i>Echinopartum ibericum</i> (<i>E. ibericum</i>)	31
1.5.2. <i>Pterospartum tridentatum</i> (<i>P. tridentatum</i>)	32

1.5.3. <i>Juniperus communis</i> (<i>J. communis</i>)	33
1.5.4. <i>Ruscus aculeatus</i> (<i>R. aculeatus</i>)	34
1.5.5. <i>Rubus ulmifolius</i> (<i>R. ulmifolius</i>)	35
1.5.6. <i>Hakea sericea</i> (<i>H. sericea</i>)	36
1.5.7. <i>Cytisus multiflorus</i> (<i>C. multiflorus</i>)	37
1.5.8. <i>Crataegus monogyna</i> (<i>C. monogyna</i>)	38
1.5.9. <i>Erica arborea</i> (<i>E. arborea</i>)	39
1.5.10. <i>Ipomoea acuminata</i> (<i>I. acuminata</i>)	40
1.5.11. <i>Ailanthus altissima</i> (<i>A. altissima</i>)	41
1.6. Objetivos	42
Capítulo 2 - Publicações	43
2.1. Caracterização dos compostos bioativos com atividade antioxidante de extratos de alguns arbustos portugueses (Artigo 1)	45
2.2. <i>Ailanthus altissima</i> : uma fonte de compostos bioativos com atividade antioxidante (Artigo 2)	57
2.3. Propriedades anti-microbianas, anti-biofilme e citotóxicas de extratos de <i>Hakea sericea</i> (Artigo 3)	75
2.4. Um novo derivado da família dos alquenilresorcinóis com propriedades anti-microbianas, isolado a partir dos frutos de <i>Hakea sericea</i> (Artigo 4)	85
2.5. Isolamento, identificação e determinação da atividade anti-microbiana do ácido 9-(3,5-dihidroxi-4-metilfenil)nona-3-(Z)-enóico (Pedido Provisório de Patente)	91
2.6. Atividade dos ácidos gálico, cafeico e clorogénico em células planctónicas e em biofilmes de <i>S. aureus</i> (Artigo 5)	103
2.7. Propriedades biológicas dos alquilresorcinóis: Mini-revisão (Artigo 6)	117
Capítulo 3 - Discussão Geral	131
Capítulo 4 - Conclusões	145
Capítulo 5 - Perspetivas Futuras	149
Capítulo 6 - Referências Bibliográficas	153
Apêndice - Notas sobre a colheita, identificação e preparação das espécies vegetais para catalogação em Herbário	169
Colheita, identificação e catalogação das espécies vegetais	171
Anexo 1	173
Anexo 2	175

Índice de Figuras

Figura 1: Estruturas químicas gerais das diferentes categorias de compostos bioativos das plantas: alcaloides (a1 e a2); monoterpenos (b); sesquiterpenos (c); triterpenos, saponinas e esteroides (d); flavonoides (e); antraquinônicos (f) (adaptada de [5]).	6
Figura 2: Esquema simplificado das várias vias de síntese dos três principais grupos de compostos bioativos das plantas (adaptado de [5], [14]).	6
Figura 3: Fluxograma para o estudo integrado de plantas medicinais (adaptado de [5]).	8
Figura 4: Formação do complexo flavonoide-alumínio, em solução metanólica, com cloreto de alumínio (retirada de [21]).	10
Figura 5: Principais classes de compostos fenólicos (adaptada de [49], [51]).	19
Figura 6: Reação entre o DPPH e a substância antioxidante, dadora de um átomo de hidrogénio (retirada de [54]).	20
Figura 7: Ciclo de crescimento do biofilme: A) células planctónicas; B) adesão reversível a uma superfície; C) Início da secreção de EPS pelas bactérias, tornando a adesão irreversível; D) o biofilme maduro adquire estrutura tridimensional; E) Biofilme completamente maduro; F) Dispersão de bactérias do biofilme para colonizarem outras superfícies distantes (retirada de [65]).	25
Figura 8: Diagrama conceptual dos mecanismos de resistência dos biofilmes (adaptado de [65]).	26
Figura 9: Presença de células ‘persistentes’ nos biofilmes (adaptada de [65]).	27
Figura 10: Fotografia da caldoneira na época da floração.	32
Figura 11: Pormenor das flores amarelas da carqueja.	33
Figura 12: Fotografia do zimbro, mostrando as suas bagas.	34
Figura 13: Fotografia da gilbardeira.	35
Figura 14: Pormenor das flores (à esquerda) e dos frutos (à direita) da espécie <i>R. ulmifolius</i> .	36
Figura 15: Fotografia da espécie <i>H. sericea</i> .	37
Figura 16: Giesta-branca florida.	38

Figura 17: Flores (à esquerda) e frutos maduros (à direita) da espécie <i>C. monogyna</i> .	39
Figura 18: Urze-branca em flor.	40
Figura 19: Pormenor da flor da espécie <i>I. acuminata</i> .	40
Figura 20: Fotografia da espécie <i>A. altissima</i> .	41

Figuras 10 a 20: Fotografias tiradas por Ângelo Luís.

Índice de Tabelas

Tabela 1: ROS e RNS de interesse biológico (adaptada de [27]).	13
Tabela 2: Principais grupos de compostos antioxidantes presentes nos alimentos (adaptada de [27]).	17
Tabela 3: Doenças associadas a biofilmes (adaptada de [65]).	24

Lista de Acrónimos e Abreviaturas

%I / I%	Porcentagem de Inibição
AAI	Índice de Atividade Antioxidante (<i>Antioxidant Activity Index</i>)
Abs	Absorvência
ABTS	<i>2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)</i>
ADP	Adenosina difosfato
AHLs	Homoserina lactonas
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosina trifosfato
BHA	hidroxi-anisol butilado (<i>Butylated Hydroxyanisole</i>)
BHI	<i>Brain Heart Infusion Agar</i>
BHT	hidroxi-tolueno butilado (<i>Butylated Hydroxytoluene</i>)
BOX	<i>bis-1,3-dibutylbarbutiric acid</i>
CC	Cromatografia em Coluna
CFU	Unidades Formadoras de Colônias (<i>Colony-forming Units</i>)
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COX	Ciclooxigenase
CTC	<i>5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico (<i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
DPPH-H	2,2-difenil-1-picril-hidrazina
EB	Brometo de Etídio (<i>Ethidium Bromide</i>)
EPS	Substância exopolimérica (<i>Exopolymeric Substance</i>)
FBS	Soro Fetal Bovino (<i>Fetal Bovine Serum</i>)
FSC	<i>Forward scatter</i>
FTIR	<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>
GAE	Equivalentes de Ácido Gálico (<i>Galic Acid Equivalents</i>)
GPS	Sistema de Posicionamento Global (<i>Global Positioning System</i>)
HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (<i>High Performance Liquid Chromatography</i>)
HRMS	Espectrometria de Massa de Alta Resolução (<i>High Resolution Mass Spectrometry</i>)
IC ₅₀	Concentração Inibitória 50%
IR	Infravermelho (<i>Infrared</i>)
LOX	Lipoxigenase

MBC	Concentração Mínima Bactericida (<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>)
MCF-7	<i>Michigan Cancer Foundation-7 / Human breast adenocarcinoma cells</i>
MHA	<i>Müller-Hinton Agar</i>
MHB	<i>Müller-Hinton Broth</i>
MIC	Concentração Mínima Inibitória (<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>)
MLC	Concentração Mínima Letal (<i>Minimum Lethal Concentration</i>)
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistentes à meticilina (<i>methicillin-resistant S. aureus</i>)
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NHDF	<i>Normal Human Dermal Fibroblasts</i>
NMR	Ressonância Magnética Nuclear (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
O.D. / OD	Densidade Ótica (<i>Optic Density</i>)
PBS	Tampão Fosfato Salino (<i>Phosphate Buffer Saline</i>)
PG	Galato de propilo (<i>propyl gallate</i>)
PI	Iodeto de Propídio (<i>Popidium Iodide</i>)
PNE	Equivalentes de Nitrato de Pilocarpina (<i>Pilocarpine Nitrate Equivalentents</i>)
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
QE	Equivalentes de Quercetina (<i>Quercetin Equivalentents</i>)
QS	<i>quorum-sensing</i>
RBC	Glóbulos Vermelhos (<i>Red Blood Cells</i>)
RNS	Espécies Reativas de Azoto (<i>Reactive Nitrogen Species</i>)
ROS	Espécies Reativas de Oxigénio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
RP-HPLC	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa (<i>Reversed-Phase-High Performance Liquid Chromatography</i>)
SA	<i>Staphylococcus aureus</i>
SDA	<i>Sabouraud Dextrose Agar</i>
SEM	Microscopia Eletrónica de Varrimento (<i>Scanning Electron Microscopy</i>)
SOD	Superóxido Dismutase
SSC	<i>Side scatter</i>
TBHQ	<i>tert</i> -butil-hidroquinona
TLC	Cromatografia em Camada Fina (<i>Thin Layer Chromatography</i>)
TSB	<i>Tryptone Soya Broth</i>
UV	Ultravioleta
XTT	<i>3'-{1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis (4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate</i>

Lista de Publicações e Comunicações

Artigos

Ângelo Luís, Fernanda Domingues, Ana Paula Duarte - “Bioactive Compounds, RP-HPLC Analysis of Phenolics, and Antioxidant Activity of Some Portuguese Shrub Species Extracts”, *Natural Product Communications*, Vol. 6, No. 12, 1863 - 1872, 2011;

Ângelo Luís, Nuno Gil, Maria Emília Amaral, Fernanda Domingues, Ana Paula Duarte - “*Ailanthus altissima* (Miller) Swingle: A Source of Bioactive Compounds with Antioxidant Activity”, *BioResources*, 7 (2), 2105 - 2120, 2012;

Ângelo Luís, Carla Cruz, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues - “An Alkenylresorcinol Derivative from *Hakea sericea* Fruits and their Antimicrobial Activity”, *Natural Product Communications*, Vol. 8, No. 10, 1459 - 1462, 2013;

Ângelo Luís, Filomena Silva, Sónia Sousa, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues - “Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids”, *Biofouling*, Vol. 30, No. 1, 69 - 79, 2014;

Ângelo Luís, Luiza Breitenfeld, Susana Ferreira, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues - “Antimicrobial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Hakea sericea* Schrader extracts”, *Pharmacognosy Magazine*, Volume 10, Issue 37 (Supplement), S6 - S13, 2014;

Ângelo Luís, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues - “Biological Properties of Alkylresorcinols”, submetido à revista *Phytochemistry* na categoria de “Short Review - *Molecules of Interest*”.

Patente

Ângelo Luís, Carla Cruz, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues - “An Alkenylresorcinol Derivative from *Hakea sericea* Fruits and their Antimicrobial Activity”, Pedido Provisório de Patente N.º 107033 (PT).

Comunicações Orais

Simpósio UMTF 2010: Materiais e Processos Inovadores, 2 e 3 de dezembro de 2010, Universidade da Beira Interior, Ângelo Luís, Fernanda Domingues, Ana Paula Duarte, “Antioxidant activity and bioactive compounds of methanolic extracts of some Portuguese shrub species”, Livro de Atas pág. 43-46, ISBN: 978-989-654-074-6;

Simpósio UMTF 2011: Transferência de Conhecimento e Tecnologia, 15 e 16 de dezembro de 2011, Universidade da Beira Interior, Ângelo Luís, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues, “Biological activities of *Hakea sericea* Schrader”, Livro de Atas pág. 53-56, ISBN: 978-989-654-084-5;

RRB8 - Eighth International Conference on Renewable Resources, Toulouse, France, 4-6 June 2012, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues, Ângelo Luís, “Bioactive Compounds from *Hakea sericea* Schrader Extracts: Antioxidant and Antimicrobial Activities”;

IV Simpósio de Farmácia - 1st International Symposium of Pharmacy: “Biotecnologia e Farmácia”, 6 de julho de 2012, Escola Superior de Saúde, Instituto Politécnico da Guarda, Ângelo Luís, Luiza Breitenfeld, Susana Ferreira, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues, “Propriedades antimicrobianas e citotóxicas de extratos metanólicos de *Hakea sericea* Schrader”, Guia do Simpósio pág. 48-54, ISBN: 978-972-8681-44-9;

Simpósio UMTF 2012: Materiais e Processos Sustentáveis, 6 e 7 de dezembro de 2012, Universidade da Beira Interior, Ângelo Luís, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues, “Antibacterial properties of some naturally occurring phenols against *Staphylococcus aureus*”, Livro de Atas;

VI ENEBIOQ: Encontro Nacional de Estudantes de Bioquímica - “Todos os caminhos vão dar à Bioquímica”, 22 a 24 de março de 2013, Universidade de Aveiro, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues, Ângelo Luís, “Bioactivity of Some Portuguese Shrub Species Extracts. *Hakea sericea* Schrader extracts - Antimicrobial, antibiofilm and cytotoxic activities”;

ICEUBI2013 - International Conference on Engineering UBI 2013 - Engineering for Economic Development, 27-29 de novembro de 2013, Faculdade de Engenharia, Universidade da Beira Interior, Ângelo Luís, Carla Cruz, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues, “New antibacterial

alkenylresorcinol derivative from *Hakea sericea* fruits”, Conference Program ISBN: 978-989-654-20-0.

Comunicações em Painel

IMBEFI 1 - 1st Iberian Meeting on Natural Bioactives Entrapment for the Food Industry - Challenges and Perspectives, from Nanotechnology to Bioavailability, May 12-13, 2011, Instituto Superior de Agronomia, Lisboa, Ângelo Luís, Fernanda Domingues, Ana Paula Duarte, “Extraction and characterization of bioactive compounds with antioxidant activity from some Portuguese shrub species”, Poster 6 (P6);

COIFFA - Lisboa 2011 - Conferência Ibero-Americana de Faculdades de Farmácia, 19 a 23 de junho de 2011, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues, Ângelo Luís, “Compostos Bioativos de Extratos de Espécies Arbustivas Portuguesas - Atividade Antioxidante e Análise dos Polifenóis por RP-HPLC”, Revista Portuguesa de Farmácia, P-E-09;

XXII Encontro Nacional da Sociedade Portuguesa de Química, 3 a 6 de julho de 2011, Braga, Ângelo Luís, Fernanda Domingues, Ana Paula Duarte, “Extração e Caracterização dos Compostos Bioativos com Atividade Antioxidante de Espécies Arbustivas”, Livro de Resumos pág. 97, QA CP 18, ISBN: 978-989-8124-08-1;

5th International Conference on Polyphenols and Health, 17 a 20 de outubro de 2011, Sitges, Barcelona, Ângelo Luís, Fernanda Domingues, Ana Paula Duarte, “Bioactive Compounds From Extracts of Some Portuguese Shrub Species - Antioxidant Activity and RP-HPLC Analysis of Phenolics”, Final Programme pág. 154, Poster 110 (P110);

CESAR 2012 - Central European Symposium on Antimicrobials and Antimicrobial Resistance, Primošten, Croatia, 23-26 September 2012, Ângelo Luís, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues, “Antimicrobial activities of *Juniperus communis* L. and pure compounds”, Book of Abstracts pág. 64, P7, ISBN: 978-953-7778-04-0;

CEF 2012 - Conferência do Centro de Estudos Farmacêuticos, Faculdade de Farmácia, Universidade de Coimbra, 25 de setembro de 2012, Joana Fernandes, Ângelo Luís, Ana Paula Duarte, “Anti-inflammatory and antioxidant activities of methanolic extracts of *Pterospartum tridentatum*”, Vencedora do 3º Prémio de Comunicação na Categoria de *Drug Discovery*;

ICAR 2012 - II International Conference on Antimicrobial Research, 21-23 de novembro de 2012, Lisboa, **Ângelo Luís**, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues, “Antistaphylococcal activity of naturally occurring phenols”, T20;

FEMS 2013 - 5th Congress of European Microbiologists, July 21-25 2013, Leipzig, Alemanha, **Ângelo Luís**, Sónia Sousa, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues, “The activity of gallic, caffeic and chlorogenic acids in biofilm prevention and control of *Staphylococcus aureus*”, Program Book pág. 80, Poster 87;

ISANH2014 Polyphenols: 8th World Congress on Polyphenols Applications, June 5-6, 2014, Lisboa, **Ângelo Luís**, Carla Cruz, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues, “A new antibacterial alkenylresorcinol derivative isolated from *Hakea sericea* fruits”, aceite para comunicação em painel;

EWLP2014 - 13th European Workshop on Lignocellulosics and Pulp, June 24-27 - 2014, Seville, **Ângelo Luís**, Carla Cruz, Fernanda Domingues, Ana Paula Duarte, “*Hakea sericea* Schrader: a source of bioactive compounds”, aceite para comunicação em painel.

1.1. Introdução

Desde há mais de 5000 anos que a medicina se apoia na utilização de plantas com fins terapêuticos, pelas suas numerosas propriedades, designadamente, analgésicas, diuréticas, antioxidantes e antissépticas [1]. Atualmente, a avaliação científica e experimental das propriedades das plantas, que os ancestrais utilizavam na medicina tradicional, conhece um grande desenvolvimento, nomeadamente na procura de novos compostos com propriedades antioxidantes e anti-microbianas [1]. Os compostos com propriedades antioxidantes podem ser utilizados na medicina no tratamento de patologias, relacionadas com o stresse oxidativo, em alternativa à terapêutica habitual, ou pela indústria alimentar, na confeção de alimentos funcionais, ou como substitutos dos antioxidantes sintéticos [1]. Os compostos anti-microbianos podem ser utilizados no tratamento de infeções por microrganismos resistentes aos antibióticos convencionais e na indústria alimentar na conservação dos alimentos [1].

A floresta portuguesa é um ecossistema muito antigo, inicialmente com árvores de folha caduca no norte do país e árvores de folha perene a sul [2]. Atualmente, a área florestal portuguesa ascende aos 3,3 milhões de hectares, o que representa cerca de 38% do território, sendo uma importante fonte de matéria-prima com potencial atividade biológica [2]. De entre o conjunto de constituintes ativos das plantas, os fenóis e os flavonoides têm sido estudados quanto às suas propriedades antioxidantes e de sequestração de radicais livres, assim como na inibição da peroxidação lipídica [3]. As propriedades anti-microbianas destes compostos têm sido referidas, pois estes exercem nas plantas ação protetora contra microrganismos patogénicos [4].

1.2. Compostos bioativos

A história da utilização de plantas pelos Homens é tão antiga quanto o início da humanidade [5]-[7]. Inicialmente, as pessoas usavam as plantas devido aos seus benefícios nutricionais, mas após a descoberta de propriedades medicinais, a flora natural tornou-se útil para o tratamento de doenças e para a melhoria da saúde das comunidades [5]-[7]. Alguns registros em papiros egípcios descrevem que os óleos de rícino e de coentros eram utilizados em diversas aplicações medicinais, cosméticas e também como conservantes. Durante o período grego e romano, foram descritas várias utilizações terapêuticas de plantas e ervas, por Hipócrates, Teofrasto, Celso, Dioscorides, entre outros [5]-[7]. Experiências *in vitro* e *in vivo* têm demonstrado os efeitos benéficos para a saúde humana, de alguns compostos com origem nas plantas, normalmente designados por compostos bioativos [8].

1.2.1. Definição de compostos bioativos

Todos os organismos vivos, desde as bactérias até aos milhares de células constituintes das plantas, biossintetizam diversos compostos químicos necessários para o seu desenvolvimento e sobrevivência. Estes compostos são divididos em duas categorias: os metabolitos primários, que são as substâncias químicas destinadas ao crescimento e desenvolvimento, tais como os hidratos de carbono, os aminoácidos, as proteínas e os lípidos, e que provêm do metabolismo primário; e os metabolitos secundários, que são o grupo de compostos que aumentam a capacidade global de sobrevivência, levando, no caso das plantas, à interação das mesmas com a vizinhança [9]. Portanto, os metabolitos secundários das plantas são muitas vezes produzidos numa fase subsequente ao crescimento, não desempenhando por isso funções no crescimento (embora possam ajudar na sobrevivência), e têm por isso, estruturas químicas invulgares e por vezes são formados como misturas ou como derivados de uma determinada família de compostos [9], [10]. A produção destes metabolitos é regulada pelas necessidades específicas de cada espécie, por exemplo, a produção de compostos voláteis pelas flores, para atração de insetos polinizadores, e a síntese de compostos tóxicos no sentido de afastar patogêneos e herbívoros, e para suprimir o crescimento de plantas vizinhas [9], [10]. Alguns metabolitos secundários têm efeito sobre os sistemas biológicos e por isso são considerados bioativos. Assim, uma definição simples para compostos bioativos, provenientes de plantas, é: metabolitos secundários que exercem efeitos farmacológicos e/ou toxicológicos em humanos e/ou animais [5]-[7].

1.2.2. Funções dos compostos bioativos nas plantas

Os mecanismos de defesa das plantas no combate a herbívoros e patogêneos envolvem diferentes estratégias que vão desde as barreiras físicas, tais como, camadas de cera, espinhos, produção de resina, até à resistência química que é atribuída aos metabolitos

secundários [8], [11]-[13]. Estes compostos das plantas exercem proteção contra macro- e microrganismos, e incluem os alcaloides, terpenos, esteroides e compostos fenólicos [8], [11]-[13]. Está descrito que, fenóis simples, como o ácido clorogénico ou o ácido cafeico, ou fenóis mais complexos, como os taninos, podem ser diretamente tóxicos para muitos microrganismos. Além de fornecerem proteção contra estes stresses bióticos, os compostos fenólicos também protegem as células e tecidos das plantas contra os danos oxidativos induzidos por stresses abióticos, atuando como antioxidantes [8], [11]-[13]. Como os compostos fenólicos possuem todas estas propriedades nas plantas, podem também ser utilizados, devido a esta bioatividade, em humanos, quer na prevenção e controlo de algumas doenças crónicas, quer na conservação de alimentos [8], [11]-[13].

1.2.3. Classificação e biossíntese de compostos bioativos

A classificação dos compostos bioativos em diferentes categorias não é consensual e depende dos autores. Por exemplo, as classificações biossintéticas baseiam-se na origem natural dos compostos e são independentes das suas ações farmacológicas [5]-[7]. Neste sentido, os compostos bioativos podem ser divididos em três categorias principais: terpenos e terpenoides, alcaloides e compostos fenólicos [9], [10]. As estruturas químicas gerais das diferentes categorias de compostos bioativos encontram-se representadas na Figura 1. A maioria dos compostos bioativos pertence a uma destas famílias, cada uma com as suas características estruturais particulares, decorrentes da forma como são sintetizados naturalmente (biossíntese) [5]-[7], [9], [10]. Existem quatro vias principais de síntese dos metabolitos secundários ou compostos bioativos: a via do ácido chiquímico, a via do ácido malónico, a via do ácido mevalónico e a via não-mevalonato [5]-[7].

Os alcaloides são produzidos a partir de aminoácidos aromáticos (via do ácido chiquímico) e de aminoácidos alifáticos (provenientes do ciclo do ácido tricarbóxico) [5]-[7]. Os compostos fenólicos são sintetizados através da via do ácido chiquímico e da via do ácido malónico [5]-[7]. Os terpenos provêm da via do ácido mevalónico e da via não-mevalonato [5]-[7]. Encontra-se na Figura 2 uma representação simplificada das várias vias de síntese dos três grupos principais de compostos bioativos das plantas.

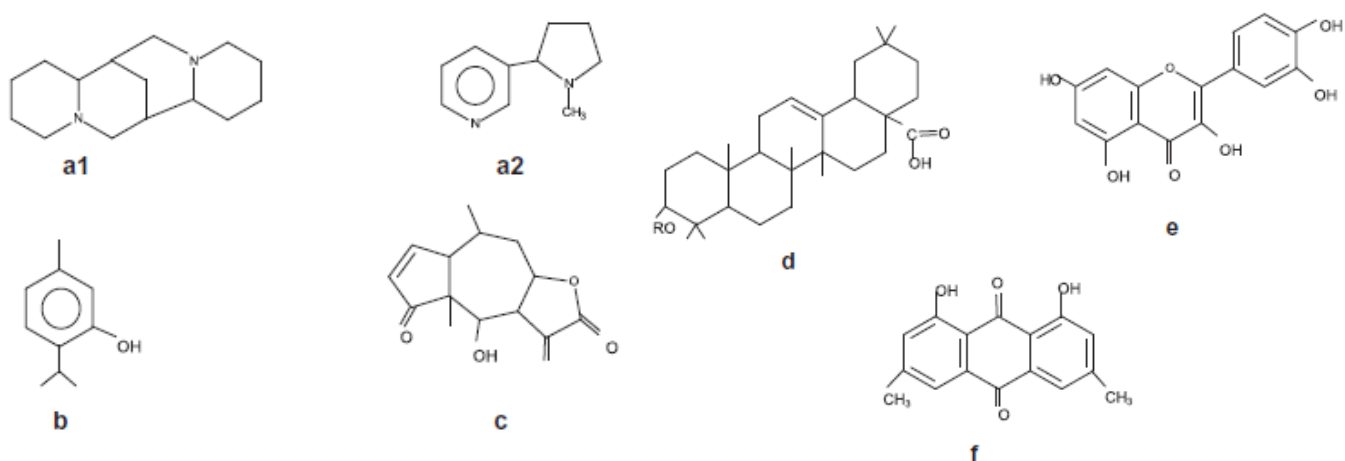


Figura 1: Estruturas químicas gerais das diferentes categorias de compostos bioativos das plantas: alcaloides (a1 e a2); monoterpenos (b); sesquiterpenos (c); triterpenos, saponinas e esteroides (d); flavonoides (e); antraquinônicos (f) (adaptada de [5]).

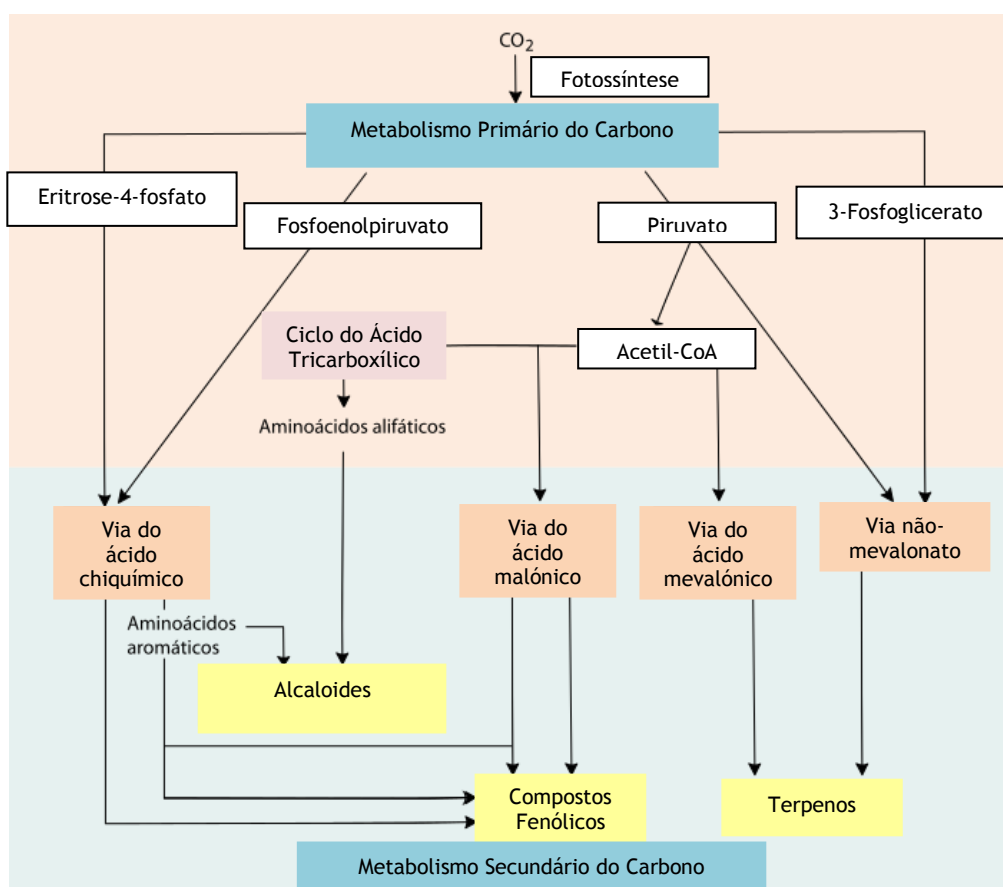


Figura 2: Esquema simplificado das várias vias de síntese dos três principais grupos de compostos bioativos das plantas (adaptado de [5], [14]).

1.2.4. Extração de compostos bioativos

Considerando-se a grande variedade de compostos bioativos e o grande número de espécies de plantas, é necessário implementar uma abordagem padronizada e integrada de modo a analisar estes compostos. Encontram-se descritas diversas metodologias e ‘marchas de análise’ que se baseiam numa abordagem sequencial integrada do estudo de plantas medicinais, começando no nome da planta até à industrialização de todo o processo [5]-[7]. Está exemplificado na Figura 3 um fluxograma para o estudo de plantas medicinais. Este estudo deve começar por uma revisão da literatura sobre as plantas que se pretendem estudar, tendo em conta as suas utilizações na medicina tradicional. Depois devem considerar-se as propriedades tóxicas das plantas em estudo, e escolher um método de extração adequado. De seguida, analisa-se o perfil fitoquímico dos extratos, no que respeita aos compostos bioativos, e avaliam-se as propriedades biológicas dos mesmos. A fase seguinte consiste em demonstrar a ação dos extratos *in vivo*, para que no final todo o processo possa ser industrializado [5].

O estudo e posterior caracterização, separação e identificação dos compostos bioativos, só é possível empregando um método de extração adequado [5]-[7]. São conhecidas várias técnicas de extração dos compostos bioativos, algumas das quais permaneceram inalteradas ao longo dos séculos, nomeadamente a decocção [5]-[7]. No entanto todas elas têm como objetivos a extração dos compostos bioativos da amostra de planta, aumentar a seletividade dos métodos analíticos subsequentes, aumentar a sensibilidade dos bioensaios (aumentando a concentração de compostos específicos), tornar os compostos bioativos detetáveis e constituírem métodos reprodutíveis, independentes das variações da amostra [5]-[7].

Os compostos bioativos podem ser extraídos de plantas por técnicas de extração convencional, as quais se baseiam na capacidade de extração dos diferentes solventes utilizados e na aplicação de calor e/ou agitação. As técnicas de extração convencional mais utilizadas são: extração com extrator de Soxhlet, maceração, decocção e hidrodestilação [5]. Apesar destas técnicas continuarem a ser as mais empregues na extração de compostos bioativos, apresentam algumas desvantagens, nomeadamente, longos tempos de extração, necessidade de evaporação de grandes quantidades de solventes, baixa seletividade de extração e, em alguns casos, a decomposição térmica de compostos termolábeis [5]. Para superar estas dificuldades, têm sido introduzidas novas técnicas de extração, referidas como não-convencionais, por exemplo: extração assistida por ultrassons, enzimas, micro-ondas e campos elétricos, extração por fluidos supercríticos e extração por líquidos pressurizados [5].

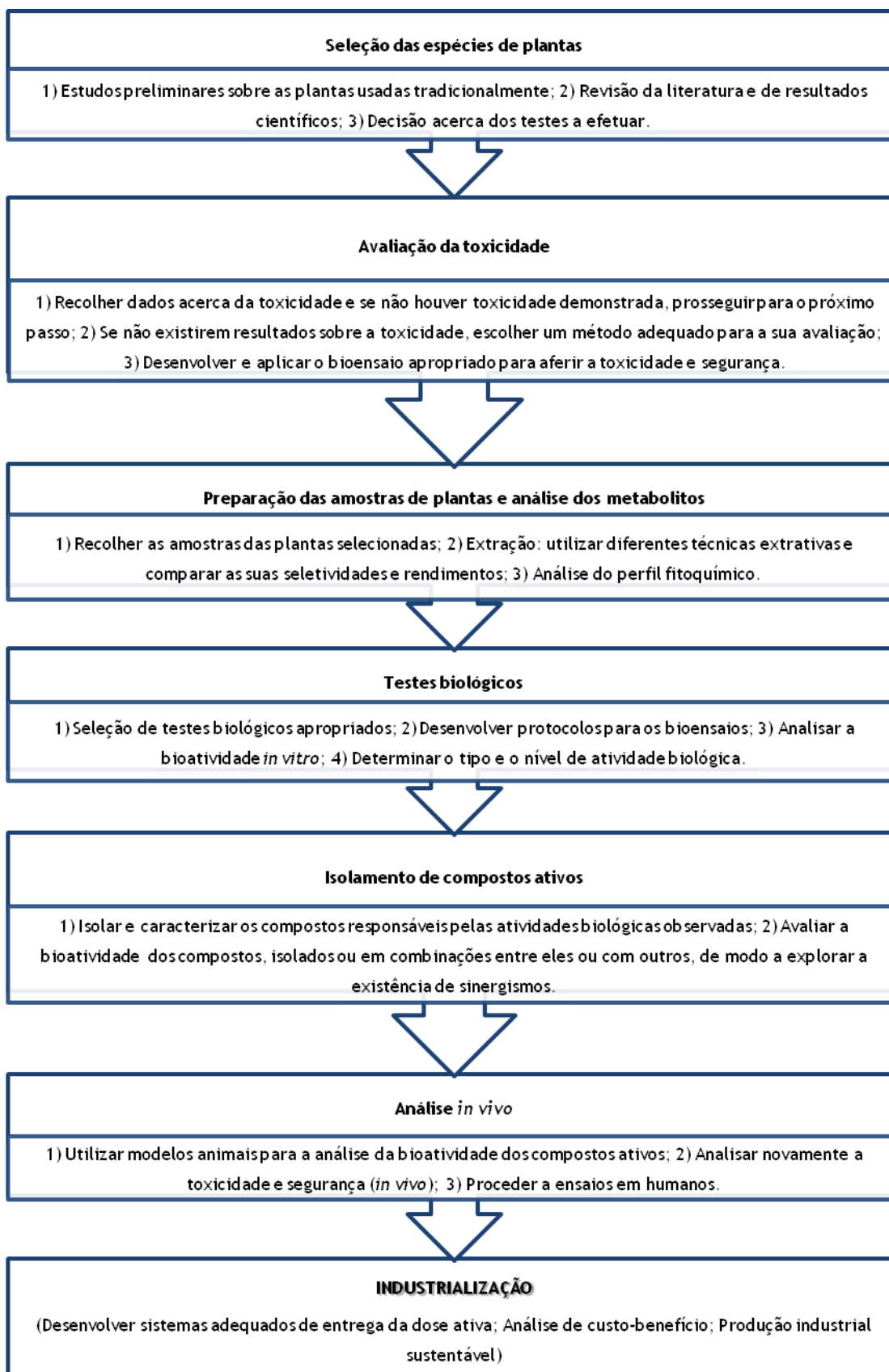


Figura 3: Fluxograma para o estudo integrado de plantas medicinais (adaptado de [5]).

1.2.5. Métodos de determinação de compostos bioativos

Após a obtenção dos extratos de plantas, é necessário analisar o seu perfil fitoquímico, avaliando, deste modo, a sua composição em compostos químicos, eventualmente bioativos. Para isso determinam-se as concentrações das diferentes classes de compostos do metabolismo secundário das plantas.

Expõe-se de seguida, os métodos para a determinação das classes de compostos estudadas neste trabalho.

1.2.5.1. Determinação de fenóis, polifenóis e taninos

A quantificação espectrofotométrica de compostos fenólicos é realizada através de diversas técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu figura entre as mais extensivamente utilizadas [15]. Este reagente consiste numa mistura dos ácidos fosfomolibdico e fosfotúngstico (designados em conjunto por ácido fosfomolibdico-túngstico) [16], no qual o molibdénio e o tungsténio se encontram no estado de oxidação +6 (com a cor amarela), porém, na presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, e em meio alcalino, formam-se os chamados molibdénio azul e tungsténio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6, e cuja coloração permite a medição colorimétrica e a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não precisam necessariamente de possuir natureza fenólica [16], [17]. Estes pigmentos azuis têm uma absorção máxima que depende da qualidade e/ou composição quantitativa das misturas de fenóis e do pH das soluções, usualmente obtido adicionando carbonato de sódio [17].

Apesar do método do reagente de Folin-Ciocalteu ser amplamente utilizado na determinação dos fenóis totais em diferentes tipos de amostras, apresenta algumas limitações, visto que mede a capacidade redutora total de uma amostra. Esta determinação correlaciona-se com a capacidade redutora e antioxidante dos compostos fenólicos. A dissociação do protão dos fenóis leva à formação do anião fenolato, que é capaz de reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu. Muitos compostos não-fenólicos, presentes em frutas e plantas, principalmente o ácido ascórbico e os açúcares redutores, também podem reduzir o reagente de Folin-Ciocalteu [16], [17].

A quantificação dos taninos baseia-se na sua precipitação, na presença de um agente de precipitação (como o pó-de-pele, a caseína ou albumina e a polivinilpolipirrolidona (PVPP)), e nas propriedades redutoras destes compostos, uma vez que são determinados através do reagente de Folin-Ciocalteu, pela diferença entre os fenóis totais e os fenóis livres, após precipitação [18]-[20].

1.2.5.2. Determinação de flavonoides

A dosagem dos flavonoides é difícil de efetuar devido ao diferente comportamento dos heterósidos e dos constituintes aglicônicos; além disso, não existe um método eficaz na eliminação de outras substâncias de natureza química diferente, que em geral acompanham os flavonoides, e que podem interferir nos métodos de dosagem [21]. Não se conhecem técnicas capazes de dosear em conjunto os diversos flavonoides contidos na mesma planta; muitas vezes, adaptam-se a grupos mais ou menos amplos de constituintes que revelam igual comportamento. Os métodos físico-químicos utilizados são colorimétricos, fluorimétricos, espectrofotométricos, cromatográficos e polarográficos. O problema inicial provém da dificuldade de isolar os derivados flavônicos das matérias-primas vegetais na sua totalidade e num estado de pureza conveniente para tal efeito [21].

Um dos processos mais usado nos métodos quantitativos consiste em precipitar os flavonoides com cloreto de alumínio (AlCl_3) em meio alcalino. Este precipitado, adquire cor, sendo assim possível, a sua dosagem colorimétrica. Os flavonoides na presença do cloreto de alumínio possuem uma fluorescência amarela intensa, quando observados no ultravioleta [21]. A utilização de cloreto de alumínio na análise da presença de alguns compostos químicos foi pela primeira vez empregue para as antocianinas. Atualmente é um método amplamente aceite e utilizado para a determinação de flavonoides [22]-[25]. Neste método, o catião alumínio forma complexos estáveis com os flavonoides (em solução metanólica) (Figura 4), ocorrendo na análise espectrofotométrica um desvio para maiores comprimentos de onda e uma intensificação da absorção. Assim, é possível determinar a quantidade de flavonoides, evitando-se as interferências de outras substâncias fenólicas, principalmente os ácidos fenólicos, que invariavelmente acompanham os flavonoides nos tecidos vegetais [21]. O complexo flavonoide-alumínio formado absorve num comprimento de onda superior ao do flavonoide sem a presença do agente complexante (AlCl_3). Os ácidos fenólicos, mesmo os que formam complexos com o cloreto de alumínio, absorvem em comprimentos de onda muito inferiores, evitando-se deste modo, interferências nas leituras das absorvências [21].

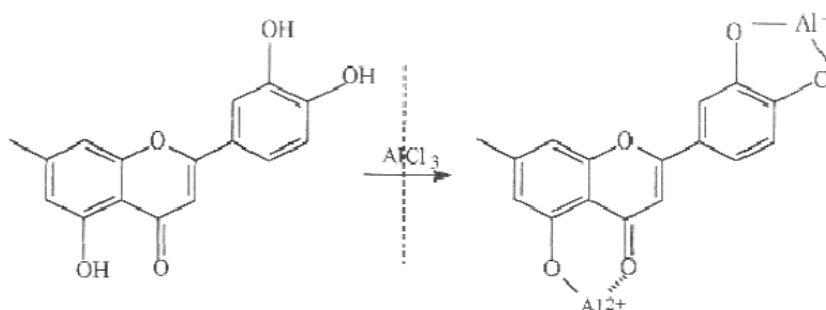


Figura 4: Formação do complexo flavonoide-alumínio, em solução metanólica, com cloreto de alumínio (retirada de [21]).

A utilização do cloreto de alumínio na determinação da quantidade de flavonoides totais não é, no entanto, um procedimento isento de limitações. O método é preciso, isto é, é um método reprodutível, fornecendo desvios muito pequenos, ou quase nulos, entre um ensaio e outro com a mesma amostra. No entanto, pode ser pouco exato, ou seja, o valor que fornece pode ser diferente (geralmente inferior) em relação à quantidade de flavonoides totais realmente presentes na amostra analisada. O valor medido e o valor real são tanto mais próximos entre si quanto maior a proporção de flavonóis na amostra, e tanto mais distantes quanto maior a proporção de flavonas. Isto porque, o comprimento de onda selecionado (415-425nm) corresponde à banda de absorção do complexo quercetina-alumínio. Os complexos de outros flavonóis com alumínio absorvem bem próximo da banda 415-425nm, mas os complexos derivados de flavonas absorvem em comprimentos de onda inferiores, o que causa uma subestimativa nas determinações de misturas muito ricas em flavonas [21].

1.2.5.3. Determinação de alcaloides

Para a quantificação dos alcaloides presentes em extratos vegetais, tem-se recorrido ao reagente de Dragendorff, que consiste numa mistura de nitrato de bismuto, ácido acético e iodeto de potássio [26]. Segundo este método, os alcaloides são precipitados na forma do complexo $(\text{Bi}_3)(\text{Alcaloide}\cdot\text{HI})$, pelo reagente de Dragendorff (KBiI_4). O bismuto forma um complexo amarelo $(\{\text{Bi}[\text{CS}(\text{NH}_2)_3]\}_3(\text{NO}_3)_3)$, em meio acidificado pelo ácido nítrico e na presença de tiureia [26]. A manutenção do pH é muito importante na precipitação dos alcaloides pelo reagente de Dragendorff; se o meio estiver muito ácido, o precipitado é dissolvido. Após formação do complexo alcaloídico, o bismuto formado é libertado pelo sulfureto de sódio [26]. Se a concentração de bismuto for muito elevada, a precipitação ocorre após adição da solução de tiureia, por outro lado, se a concentração de tiureia for elevada, a precipitação dos alcaloides também ocorre [26].

1.3. Atividade antioxidante

Os radicais livres estão na origem de diversas doenças, uma vez que modificam várias moléculas biológicas cruciais, levando a alterações funcionais ou à perda da sua função [27]. Os antioxidantes podem proteger contra os danos induzidos pelos radicais livres. Estudos recentes têm mostrado várias estratégias para proteger os tecidos e órgãos contra os danos oxidativos induzidos pelos radicais livres, uma das quais inclui a utilização de antioxidantes [27]-[30]. As plantas constituem a maior fonte de antioxidantes naturais e uma maior ingestão de alimentos funcionais, que incluam substâncias antioxidantes, é outra estratégia que tem ganho importância nos países desenvolvidos [27].

1.3.1. Radicais livres no corpo humano

Os radicais livres, e as Espécies Reativas de Oxigênio e de Azoto (ROS e RNS), têm ganho grande relevância devido aos seus efeitos adversos no organismo humano [31]. O termo 'radical livre' é por vezes utilizado com um amplo sentido, incluindo também as espécies reativas relacionadas com os radicais livres, tais como os estados excitados que levam à formação de radicais livres, e as substâncias que resultam de reações com radicais livres [31]. Na Tabela 1 encontram-se sumariadas algumas características de radicais livres biologicamente importantes. Tem-se considerado que os radicais livres estão na etiologia de várias doenças e também no processo natural de envelhecimento. No entanto, também se tem destacado que as ROS e RNS são produzidas de forma regulada, mantendo a homeostase celular nos tecidos saudáveis e exercendo um papel importante, atuando como moléculas sinalizadoras [31]. Como consequência dos processos biológicos da célula há a produção de anião superóxido ($O_2^{\cdot-}$), peróxido de hidrogénio (H_2O_2) e óxido nítrico (NO), nomeadamente, durante a produção de ATP, a partir de ADP, nas mitocôndrias (fosforilação oxidativa); na destoxificação de xenobióticos pelo citocromo P450 (enzimas oxidantes); durante a apoptose de células defeituosas; na eliminação de microrganismos e células cancerígenas por macrófagos e linfócitos citotóxicos [27]. Os radicais livres também são formados após exposição a agentes físico-químicos como as radiações ionizantes (raios-X e raios- γ , além da luz visível ou UV, que interagem com compostos endógenos ou fármacos, na presença de oxigénio), poluentes atmosféricos, fumo do cigarro e químicos tóxicos [27], [31]-[33].

A relação entre radicais livres e o estado de doença pode ser explicada pelo conceito de stresse oxidativo. O stresse oxidativo resulta do desequilíbrio entre os sistemas de defesa antioxidante e a formação de moléculas pró-oxidantes, o que pode levar a danos em biomoléculas, como DNA, RNA, proteínas, enzimas, hidratos de carbono e lípidos, através da modificação oxidativa, contribuindo, deste modo, para o surgimento de algumas patologias como a diabetes, cancro, doenças cardiovasculares e neurodegenerativas e estar relacionado com os problemas associados ao envelhecimento [27], [34]-[38].

Tabela 1: ROS e RNS de interesse biológico (adaptada de [27]).

Espécies Reativas	Símbolo	Meia-vida (s)	Reatividade/Observações
ROS			
Anião Superóxido	$O_2^{\cdot -}$	10^{-6}	Gerado nas mitocôndrias e no sistema cardiovascular, entre outros.
Radical Hidroxilo	$\cdot OH$	10^{-9}	Altamente reativo, produzido durante uma sobrecarga de ferro no organismo humano.
Peróxido de Hidrogénio	H_2O_2	Estável	Formado no organismo por um grande número de reações e origina $\cdot OH$.
Radical Peroxilo	ROO^{\cdot}	s	Reativo e formado a partir de lípidos, proteínas, DNA e açúcares.
Hidroperóxido Orgânico	$ROOH$	Estável	Reage com metais de transição, formando outras espécies reativas.
Oxigénio Singleto	1O_2	10^{-6}	Muito reativo, formado durante a fotossensibilização e em reações químicas.
Ozono	O_3	s	Poluente presente na atmosfera, pode reagir com várias moléculas, produzindo 1O_2 .
RNS			
Óxido Nítrico	NO^{\cdot}	s	Neurotransmissor e regulador da pressão arterial, pode gerar oxidantes potentes em estados patológicos.
Peroxinitrito	$ONOO^{\cdot}$	10^{-3}	Formado a partir do NO^{\cdot} e do anião superóxido, muito reativo.
Ácido Peroxinitroso	$ONOOH$	Bastante estável	Obtido a partir da protonação do $ONOO^{\cdot}$.
Dióxido de Azoto	NO_2	s	Formado na poluição atmosférica.

1.3.1.1. Peroxidação lipídica

Os lípidos de membrana presentes nos organelos sub-celulares são altamente suscetíveis a danos provocados por radicais livres. Quando os radicais livres reagem com os lípidos, estes sofrem as reações em cadeia, designadas por peroxidação lipídica, com consequências, diretas e indiretas, prejudiciais para o funcionamento das células [27], [39]. Este processo é mediado por radicais livres e inicia-se devido ao ataque, por qualquer espécie, que pode abstrair um átomo de hidrogénio de um grupo metileno (CH_2), deixando um eletrão desemparelhado no átomo de carbono ($\cdot\text{CH}$) [27], [39]. O radical de carbono resultante é estabilizado por um rearranjo molecular, produzindo um dieno conjugado, o qual pode reagir com uma molécula de oxigénio para formar um radical peroxil lipídico ($\text{LOO}\cdot$). Estes radicais podem promover a subtração de átomos de hidrogénio de outras moléculas lipídicas, formando hidroperóxidos lipídicos (LOOH) e simultaneamente propagar a peroxidação lipídica [27], [39]. Esta pode ser terminada pela reação entre o radical $\text{LOO}\cdot$ ou o radical lipídico ($\text{L}\cdot$) com uma molécula antioxidante, como a vitamina E (α -tocoferol), formando o radical fenoxil tocoferol, mais estável, e que não está envolvido nas reações em cadeia da peroxidação lipídica. Este radical pode ser convertido por outros antioxidantes celulares como a vitamina C (ácido ascórbico) ou a glutathione [27], [38], [39]. Durante as reações da peroxidação lipídica, além dos radicais lipídicos, formam-se ainda um grande número de subprodutos tóxicos muito reativos, nomeadamente o dialdeído malónico, 4-hidroxinonenal e vários 2-alquenais, que podem exercer os seus efeitos noutros locais, afastados da área onde foram produzidos [27], [38], [39].

1.3.1.2. Oxidação de hidratos de carbono

Os radicais livres como o $\cdot\text{OH}$ reagem com as moléculas de hidratos de carbono, abstraindo aleatoriamente um átomo de hidrogénio a um dos átomos de carbono, produzindo um radical de carbono [27], [40]. Isto leva à quebra da cadeia de moléculas importantes como o ácido hialurónico, o que, no líquido sinovial, em conjunto com a acumulação e ativação de neutrófilos durante a inflamação, produz quantidades significativas de radicais de oxigénio, o que está implicado na artrite reumatoide [27], [40].

1.3.1.3. Oxidação de DNA

Os danos oxidativos nas moléculas de DNA são o resultado da interação entre as ROS e RNS e as próprias moléculas de DNA. Os radicais livres como $\cdot\text{OH}$, reagem com o DNA pela adição às bases ou abstraindo átomos de hidrogénio à pentose [27], [41]. A ligação dupla C4-C5 da pirimidina é particularmente sensível ao ataque de radicais livres como o $\cdot\text{OH}$, gerando vários produtos oxidados. Do mesmo modo, a interação do radical $\cdot\text{OH}$ com purinas gera produtos de degradação oxidativa [27], [41]. Conhecem-se várias vias de reparação do DNA, no entanto os produtos que resultam da oxidação de moléculas de DNA estão envolvidos na carcinogénese,

por causarem mutações nos proto-oncogenes, ativando-os, e nos genes supressores de tumores, levando à sua inativação [27], [41]. A inibição da apoptose, poderá também estar associada com a oncogénese e com alterações ao nível do DNA e poderá surgir em consequência do aumento da concentração do cálcio citoplasmático após a ação de radicais livres como as ROS e RNS [42].

1.3.1.4. Oxidação de proteínas

A alteração das propriedades das proteínas, e a formação de peróxidos de aminoácidos podem levar à degradação das proteínas, por fragmentação e formação de ligações cruzadas (*cross-linking*), o que pode resultar na sua polimerização e inativação, especificamente em proteínas que contêm grupos sulfídricos (-SH) e grupos aromáticos [42]. A oxidação de proteínas provoca ainda alteração da sua estrutura terciária que leva a agregação proteica e formação de amiloide. A oxidação de aminoácidos por radicais livres induz alteração na atividade enzimática, havendo também um comprometimento do potencial antioxidante de células e tecidos [42]. Apesar de serem removidas rapidamente, a maioria das proteínas oxidadas, que funcionalmente fiquem inativas, podem acumular-se gradualmente com o tempo e, assim, contribuir para os danos associados ao envelhecimento, assim como com várias doenças neurodegenerativas [27], [30].

1.3.2. Oxidação em produtos alimentares

A oxidação também afeta os produtos alimentares, sendo uma das principais causas de deterioração, devido à rancificação, o que leva a alterações nutricionais, de qualidade, cor, sabor, odor e textura. Os mecanismos de defesa contra os efeitos da oxidação excessiva são fornecidos pela adição de compostos antioxidantes sintéticos como o hidróxi-anisol butilado (BHA, E-320), hidróxi-tolueno butilado (BHT, E-321), *tert*-butil-hidroquinona (TBHQ, E319) e o galato de propilo (PG, E-310) [38], [43]. Estes antioxidantes são utilizados a nível industrial, mas conhecem-se os seus efeitos colaterais graves como, danos hepáticos e carcinogénese [38], [43]-[45]. Por isso têm sido aplicadas restrições cada vez mais severas sobre o seu uso, levando a substituí-los por antioxidantes naturais [46].

1.3.3. Compostos naturais como antioxidantes

As substâncias antioxidantes definem-se como, qualquer composto, que mesmo presente em menores concentrações que o substrato oxidável, atrase ou previne a sua oxidação [33]. As células possuem mecanismos de proteção específicos contra quaisquer danos provocados pelos radicais livres, nomeadamente, algumas enzimas, como, superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase, glutatona redutase, tioredoxina, entre outras [34]. A vitamina E é um

Capítulo 1 - Introdução Geral

nutriente essencial com atividade antioxidante e que funciona como quebra de cadeia, prevenindo a propagação de reações sucessivas com radicais livres em todas as células do corpo humano. A vitamina C também faz parte do mecanismo normal de proteção antioxidante. Outras substâncias antioxidantes não-enzimáticas incluem os carotenoides, flavonoides e polifenóis, ácido α -lipóico, glutathione, etc [27], [34] que também desempenham um papel fulcral na prevenção e eliminação de radicais livres [47].

Os compostos antioxidantes também podem ser divididos em duas classes, antioxidantes primários ou de quebra de cadeia e antioxidantes secundários ou preventivos [38]. Os antioxidantes primários, quando presentes em quantidades vestigiais, podem atrasar ou inibir o passo de Iniciação da peroxidação lipídica, através da reação com radicais lipídicos ou da inibição do passo de Propagação, pela reação com radicais peroxil ou alcoxil [38]. Os antioxidantes secundários ou preventivos são compostos que retardam a taxa de oxidação, o que pode ser conseguido de várias formas, incluindo a remoção do substrato ou a eliminação de oxigênio singleto [38].

Os compostos naturais, especialmente derivados de alimentos, possuem um grande número de antioxidantes (Tabela 2). Algumas bebidas, como o chá ou café, também são fontes de compostos com atividade antioxidante [27], [47], [48]. As especiarias e as plantas medicinais, com elevados níveis de vitaminas essenciais e nutrientes, por exemplo, vitamina E, licopeno, vitamina C, selênio, bioflavonoides e tioredoxina, constituem uma base de compostos antioxidantes [27], [47], [48]. Além dos alimentos, geralmente todas as plantas possuem compostos com atividade antioxidante. Estima-se que cerca de 80% da população dos países desenvolvidos ainda dependem, em grande parte, da medicina tradicional baseada nas plantas, para os seus cuidados primários de saúde [27], [47], [48]. A ideia de cultivar plantas para beneficiar a saúde ao invés de as cultivar com o objetivo de obter alimentos ou fibras está a mudar áreas como a biotecnologia vegetal e a medicina [27], [47], [48]. A redescoberta da importância das plantas na saúde humana é responsável pelo aparecimento de uma nova geração de terapias botânicas, que incluem produtos farmacêuticos derivados de plantas, medicamentos botânicos, suplementos alimentares, alimentos funcionais e proteínas recombinantes produzidas em plantas [27], [47], [48].

Nos últimos anos tem-se verificado um interesse aumentado nos alimentos funcionais, isto é, alimentos que satisfazem não só as necessidades nutricionais e energéticas básicas, mas também fornecem benefícios fisiológicos adicionais [38], [43]. Normalmente a funcionalidade de um alimento está relacionada com alguns dos seus ingredientes e os consumidores preferem, cada vez mais, componentes de origem natural (isto é, não-sintéticos), que podem ser extraídos de plantas, subprodutos alimentares ou outras fontes naturais [38], [43]. A incorporação de antioxidantes naturais nos alimentos tem sido uma estratégia utilizada por forma a proteger os alimentos da oxidação e que também os pode converter em alimentos funcionais [38], [43].

Tabela 2: Principais grupos de compostos antioxidantes presentes nos alimentos (adaptada de [27]).

Compostos Polifenólicos	Fontes Alimentares
<p>Flavonoides com atividade antioxidante: antocianidinas, auronas, chalconas, flavanonas (naringenina), flavanóis (procianidina), flavan-3-ol (epicatequina e catequina), flavonas (apigenina, luteolina), flavonóis (isoramnetina, caempferol, miricetina, quercetina, glicósidos de quercetina, rutina), isoflavonoides (anisol, cumestrol, daidzeína, genisteína).</p>	<p>Frutas: maçãs, amoras, mirtilos, citrinos, uvas, peras, romã, framboesas, morangos.</p> <p>Vegetais: beterraba, beringela, brócolos, aipo, endívias, alho-francês, alface, cebola, pimento, espinafre, tomate.</p> <p>Legumes: ervilhas, soja, feijão, grão.</p> <p>Especiarias: cardamomo, canela, cravinho, coentros, cominhos.</p>
<p>Outros polifenóis: ácido cinâmico, cumarina, taninos condensados, ácidos hidroxibenzóicos (ácido gálico, ácido protocatecuico, ácido vanílico), ácidos hidroxicinâmicos (ácido cafeico, ácido caftárico, ácido clorogénico, ácido cumárico, ácido ferúlico, ácido sináptico), proantocianidinas.</p>	<p>Bebidas: cacau, chá, vinho.</p> <p>Azeite.</p> <p>Chocolates.</p>
<p>Carotenoides com atividade antioxidante: astaxantina, bixina, cantaxantina, capsorubina, α-caroteno, β-caroteno, γ-caroteno, crocina, β-criptoxantina, luteína, licopeno, zeaxantina.</p>	<p>Frutas: maçãs, alperce, banana, amoras, mirtilos, cerejas, toranja, uvas, kiwi, limão, manga, melão, laranja, papaia, pêssigo, peras, ananás, ameixa, morangos, melancia.</p> <p>Vegetais: espargos, beterraba, beringela, brócolos, couve-de-bruxelas, couve, couve-flor, pepino, cenouras, aipo, alface, cogumelos, cebola, tomates, batatas, abóbora, espinafre.</p> <p>Cereais: milho.</p> <p>Legumes: feijão, ervilhas.</p> <p>Especiarias: pimenta, açafraão.</p> <p>Óleo de palma.</p> <p>Laticínios.</p> <p>Ovos e maionese.</p>
<p>Vitaminas: vitamina C, vitamina E (α-tocoferóis e tocotrienóis), nicotinamida.</p> <p>Outros compostos: curcumina, cafeína, clorofilina, sesamisol, zingerona.</p>	<p>Groselhas, limão, laranja.</p> <p>Óleo de amendoim, azeite, óleo de palma, caju, leguminosas germinadas.</p> <p>Café, cacau, legumes verdes, chá, açafraão.</p>

Capítulo 1 - Introdução Geral

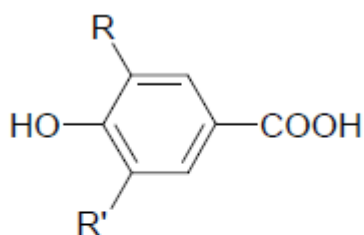
Muitos compostos isolados a partir de plantas, têm sido estudados relativamente às suas propriedades antioxidantes, atuando na prevenção de vários tipos de cancro [27], [47], [48]. Entre estes compostos, os polifenóis e os flavonoides constituem os grupos mais importantes, tendo sido já identificados mais de 5000 compostos [27], [47], [48]. Calcula-se que as plantas possuam entre 100 000 a 200 000 metabolitos secundários, e que cerca de 20% do carbono fixado pela fotossíntese é canalizado para a via fenilpropanoide, produzindo assim a maior parte dos compostos fenólicos naturais, tais como os flavonoides e os estilbenos [49], [50].

Os fenóis vegetais têm a sua origem nos aminoácidos fenilalanina ou tirosina que são desaminados, originando os ácidos cinâmicos que entram na via fenilpropanoide [49], [50]. O passo chave na via biossintética dos compostos fenólicos é a introdução de um ou mais grupos hidroxilo no anel aromático. Como resultado, estes compostos são derivados de um esqueleto de carbono comum: a unidade fenilpropanoide C_6-C_3 . A biossíntese produz uma grande variedade de fenóis vegetais: os ácidos cinâmicos (C_6-C_3) os ácidos benzoicos (C_6-C_1), os flavonoides ($C_6-C_3-C_1$), as proantocianidinas [$(C_6-C_3-C_6)_n$], as cumarinas (C_6-C_3), os estilbenos ($C_6-C_2-C_6$), as lignanas ($C_6-C_3-C_3-C_6$) e ligninas [$(C_6-C_3)_n$] [49], [50]. As estruturas dos principais compostos fenólicos estão apresentadas na Figura 5.

Os compostos fenólicos são capazes de atuar como antioxidantes de várias formas. Por exemplo, os grupos hidroxilo dos fenóis são bons doadores de átomos de hidrogénio, podendo reagir com ROS e RNS, nas reações de terminação que quebram o ciclo de produção de novos radicais. Após a interação com as espécies reativas iniciais é produzida uma forma radicalar do antioxidante, que tem uma estabilidade muito maior do que o radical químico inicial [49], [50]. A interação dos grupos hidroxilo dos compostos fenólicos com os eletrões- π do anel benzénico confere a estas moléculas algumas propriedades especiais, principalmente a capacidade de produzir radicais livres em que o radical é estabilizado por deslocalização [49], [50]. A formação destes radicais estáveis é capaz de modificar os processos de oxidação mediados por radicais. A ação antioxidante dos compostos fenólicos é também atribuída à sua capacidade de quelar iões de metais, envolvidos na produção de radicais livres [49], [50]. Os compostos fenólicos geralmente interagem fortemente com proteínas, devido aos seus anéis benzénicos hidrofóbicos e ao potencial de formar ligações de hidrogénio dos grupos hidroxilo neles presentes [49], [50]. Isto confere aos fenóis propriedades antioxidantes, também em virtude da sua capacidade para inibir algumas enzimas envolvidas na geração de radicais, tais como, diferentes isoformas do citocromo P450, lipoxigenase (LOX), cicloxigenase (COX) e xantina oxidase [49], [50]. Além disso, também têm sido descritos os efeitos sinérgicos dos compostos fenólicos com outros antioxidantes, nomeadamente a vitamina C, B-caroteno e vitamina E, assim como, a regulação dos níveis de glutathiona intracelular [49], [50].

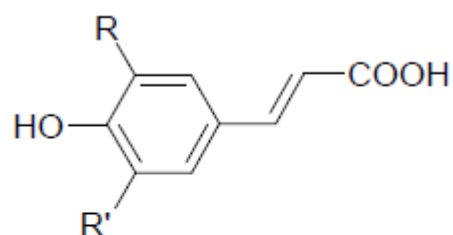
Ácidos Fenólicos

Derivados do ácido benzoico



R = R' = H; ácido *p*-hidroxibenzoico
 R = OH, R' = H; ácido protocatecuico
 R = OCH₃, R' = H; ácido vanílico
 R = R' = OH; ácido gálico
 R = R' = OCH₃; ácido siringico

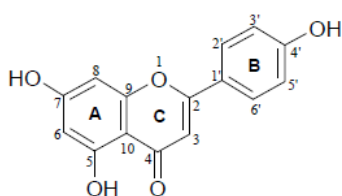
Derivados do ácido cinâmico



R = R' = H; ácido *p*-cumárico
 R = OH, R' = H; ácido cafeico
 R = OCH₃, R' = H; ácido ferúlico
 R = R' = OCH₃; ácido sináptico

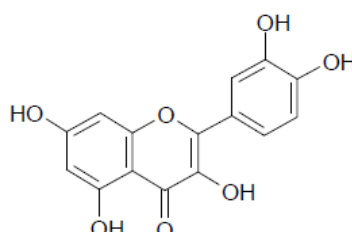
Flavonoides

Flavonas



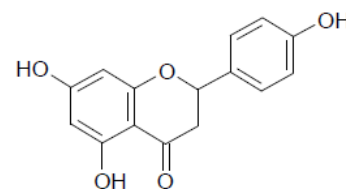
Apigenina

Flavonóis



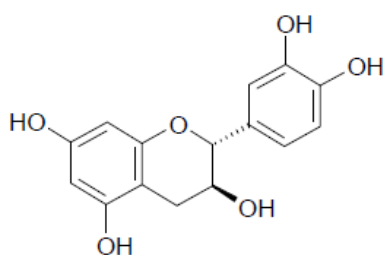
Quercetina

Flavanonas



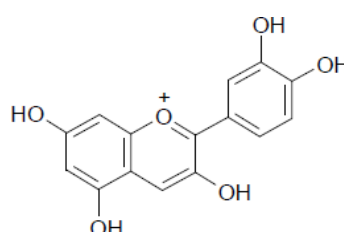
Naringenina

Flavan-3-óis



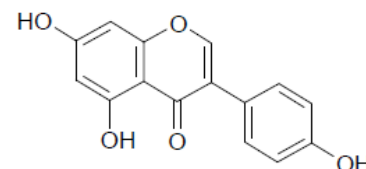
(+)-Catequina

Antocianidinas



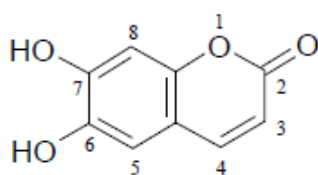
Cianidina

Isoflavonas



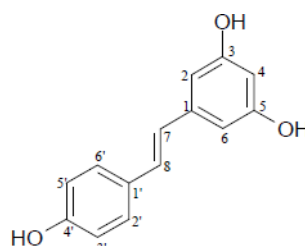
Genisteína

Cumarinas



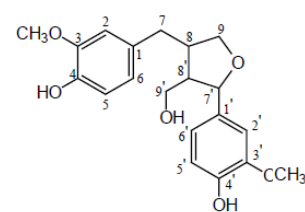
Esculetina

Estilbenos



Resveratrol

Lignanás



(-)-Lariciresinol

Figura 5: Principais classes de compostos fenólicos (adaptada de [49], [51]).

1.3.4. Métodos de determinação da atividade antioxidante

Os métodos para avaliar o comportamento antioxidante podem ser agrupados em duas categorias, que refletem a importância da atividade antioxidante nos alimentos ou a bioatividade em humanos. No caso dos sistemas alimentares, a necessidade consiste em avaliar a eficácia dos antioxidantes em fornecer uma proteção para os alimentos contra a deterioração oxidativa [38]. Os antioxidantes podem atuar por vários mecanismos, por exemplo, sequestrando os radicais livres, decompondo os peróxidos e quelando os íons metálicos. Assim sendo, a atividade antioxidante deve ser medida e avaliada por vários métodos que contemplem diferentes mecanismos químicos de atividade antioxidante [52]. Um dos problemas na determinação da atividade antioxidante é que esta é variável em função do método utilizado, uma vez que um mecanismo antioxidante, nas diversas matrizes biológicas, é muito complexo e muitos outros fatores podem intervir nesse mecanismo. Perante esta complexidade, apenas um método de determinação da atividade antioxidante não é suficiente para se chegar a uma conclusão, logo, são aplicados diferentes métodos, sendo determinadas diferentes propriedades e características antioxidantes [52].

De seguida, descrevem-se os dois métodos de avaliação da atividade antioxidante utilizados neste trabalho.

1.3.4.1. Método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil)

O método do DPPH baseia-se no estudo da atividade sequestradora do radical livre estável DPPH, de coloração púrpura, que absorve a um determinado comprimento de onda (515-517nm) [53]. Por ação de um antioxidante (RH) ou uma espécie radicalar (R^{\bullet}), o DPPH é reduzido, formando 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH-H) (Figura 6), de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorizada pelo decréscimo da absorvência. A partir dos resultados obtidos determina-se a percentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a percentagem de DPPH remanescente no meio reacional [16], [38].

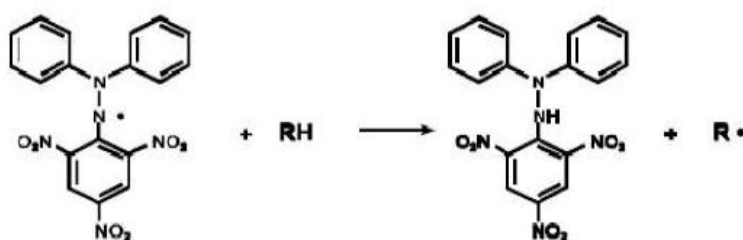


Figura 6: Reação entre o DPPH e a substância antioxidante, dadora de um átomo de hidrogénio (retirada de [54]).

A percentagem de atividade antioxidante corresponde à quantidade de DPPH consumido pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% denomina-se por concentração inibitória 50% (IC₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua IC₅₀ e maior a sua atividade antioxidante [16], [38].

1.3.4.2. Sistema β -caroteno/ácido linoleico

O sistema β -caroteno/ácido linoleico, que consiste na descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico, estima a capacidade relativa de compostos antioxidantes presentes em extratos de plantas de sequestrar o radical peróxido do ácido linoleico (LOO[•]), que oxida o β -caroteno presente na emulsão [55]. Este método tem sido amplamente utilizado, com diferentes meios de extração dos antioxidantes, para avaliar a atividade antioxidante de matrizes alimentares [56]-[59]. Como não ocorre a altas temperaturas, permite a determinação do poder antioxidante de compostos termolábeis e a avaliação qualitativa da eficácia antioxidante de extratos vegetais [55]. O mecanismo do branqueamento do β -caroteno é um fenómeno mediado por radicais hidroperóxido resultantes da oxidação, pelo oxigénio, do ácido linoleico. O radical livre do ácido linoleico, formado após a abstração de um átomo de hidrogénio de um dos seus grupos metileno-dialílicos, ataca as moléculas do β -caroteno altamente insaturadas [55]. Assim que as moléculas do β -caroteno perdem as suas ligações duplas pela oxidação, na ausência de antioxidantes, o composto perde o seu cromóforo e a sua cor-de-laranja característica, que pode ser monitorizada espectralmente [55].

1.4. Atividade anti-microbiana

Os microrganismos têm demonstrado uma grande flexibilidade e podem ser encontrados em todos os ambientes: desde os glaciares até às águas em ebulição, em ambientes com pH extremo e em locais onde a pressão é muito elevada. As suas populações numerosas e a sua plasticidade genómica permite-lhes trocar informações génicas entre espécies muito diferentes, conferindo-lhes uma elevada capacidade de adaptação [60]. Os microrganismos desenvolveram mecanismos que lhes permitem resistir a qualquer meio que o Homem desenvolva contra eles. Tornou-se claro, que o abuso e a utilização intensiva e prolongada de antibióticos, pela medicina convencional (humana e veterinária) e pela agricultura, provocaram o aparecimento e disseminação de estirpes de microrganismos patogénicos altamente resistentes aos fármacos antibióticos [60].

As moléculas de origem natural, predominantemente os metabolitos secundários das plantas, estão na origem da maior parte dos medicamentos em utilização clínica atual. Isto é especialmente notório nos agentes anti-infecciosos. Os produtos naturais ou medicamentos à base de plantas, são responsáveis por mais de 75% das 97 novas moléculas anti-microbianas aprovadas e introduzidas no mercado, no período de 1981 a 2006 [61].

1.4.1. Resistência aos antibióticos

A resistência das bactérias aos antibióticos aumenta dia a dia, quer na comunidade, quer em ambientes hospitalares, crescendo, deste modo, a mortalidade e a morbilidade. Atualmente, o desenvolvimento contínuo de resistências bacterianas, e a sua posterior disseminação, leva a uma necessidade urgente de desenvolver novos compostos com propriedades anti-microbianas [62]. A multirresistência é definida como a não-suscetibilidade a um ou mais compostos de três ou mais classes de anti-microbianos, enquanto as estirpes que não são suscetíveis a todos os anti-microbianos, são classificadas como resistentes extremas [62]. A resistência aos antibióticos é frequentemente considerada como sendo uma característica adquirida por bactérias que eram anteriormente sensíveis, e que pode ser atribuída à aquisição horizontal de novos genes, ou à ocorrência de mutações espontâneas dentro de genes localizados no cromossoma, e que são posteriormente transmitidas verticalmente às bactérias [63].

O exemplo convencional da resistência intrínseca aos antibióticos é o fenótipo exibido por bactérias Gram-negativas resistentes a múltiplos antibióticos, incluindo a classes de antibióticos clinicamente eficazes em bactérias Gram-positivas [63]. A base molecular deste fenómeno é a presença da membrana externa nas bactérias Gram-negativas, que é impermeável a muitas moléculas, e à expressão de numerosas bombas de efluxo nas estirpes multirresistentes, que reduzem efetivamente a concentração intracelular do fármaco administrado [63]. Estão identificados pelo menos quatro tipos de mecanismos de resistência

das bactérias aos anti-microbianos: a alteração da estrutura do antibiótico, a alteração do alvo do antibiótico, o efluxo dos fármacos anti-microbianos e a redução da permeabilidade da parede celular [64].

As bactérias multirresistentes têm um impacto significativo sobre a mortalidade e o tempo de internamento, e nos respetivos custos associados. Os microrganismos principalmente associados ao processo de resistência são: *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e enterobactérias [62]. O nível de resistência de *A. baumannii* ao imipenemo aumentou de 23,9% para 34,3% durante o período de 2007 a 2011. A resistência de *K. pneumoniae*, ao mesmo antibiótico, também cresceu, enquanto a taxa de resistência à metilina de estirpes de *S. aureus* diminuiu no período de 2007-2011 [64]. A disseminação de bactérias resistentes aos carbapenémicos, por exemplo, membros da família *Enterobacteriaceae*, constitui um problema, devido ao facto dos carbapenémicos serem antibióticos de amplo espectro e que muitas vezes são os únicos eficazes em infeções de difícil tratamento, e que não são tratáveis por outros antibióticos [64].

A falta de compostos antibacterianos novos e eficazes deve-se a vários fatores. Antes de mais, é difícil encontrar novos compostos antibacterianos com bons perfis farmacológicos e baixa toxicidade para o hospedeiro [64]. Além disso, do ponto de vista económico, as empresas farmacêuticas estão mais interessados no desenvolvimento de medicamentos para doenças crónicas do que para tratamentos de curto prazo [64]. E ainda, as bactérias tendem a desenvolver resistência aos anti-microbianos, o que restringe a sua utilização, e conseqüentemente, provoca um declínio nas vendas desses fármacos [64]. Por fim, as estruturas químicas dos antibióticos, especialmente os que são derivados naturais, são muito complexas. Portanto, a descoberta, *design* e desenvolvimento de novos fármacos eficientes é muito exigente [64].

1.4.2. Biofilmes

A natureza ubíqua de bactérias no ambiente, e o papel que desempenham na doença infecciosa tem sido uma das áreas mais extensivamente estudadas, o que levou, a enormes avanços científicos que visam erradicar uma série de doenças e melhorar a qualidade de vida [65], [66]. No entanto, o aparecimento de biofilmes bacterianos é um importante fator na morbidade e mortalidade da maioria das doenças infecciosas. Isto torna-se ainda mais significativo porque os biofilmes bacterianos são resistentes às abordagens terapêuticas comuns, que eliminariam as respetivas células planctónicas (células livres e em flutuação) [65], [66]. Os biofilmes são descritos como comunidades de microrganismos, associados a uma superfície, encapsulados numa matriz extracelular de proteção [65], [66]. Cerca de 80% da biomassa microbiana encontra-se no estado de biofilme, e estima-se que mais de 75% das

Capítulo 1 - Introdução Geral

infecções microbianas que ocorrem no corpo humano sejam sustentadas pela formação e persistência de biofilmes [65], [66].

Algumas doenças comuns associadas à formação de biofilmes incluem infecções pulmonares em indivíduos com fibrose quística, feridas e queimaduras infetadas, otite média, endocardite bacteriana e cárie dentária (Tabela 3) [65], [66].

Tabela 3: Doenças associadas a biofilmes (adaptada de [65]).

Microrganismo	Doença
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Infeções pulmonares (fibrose quística)
<i>Burkholderia cepacia</i>	Infeções pulmonares (fibrose quística)
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Queimaduras e feridas infetadas
<i>Helicobacter pylori</i>	Infeções gastrintestinais
<i>Escherichia coli</i>	Infeções urinárias (cateteres)
<i>Haemophilus influenzae</i>	Otite média
<i>Bordetella pertussis</i>	Infeções respiratórias
<i>Legionella pneumophila</i>	Doença do Legionário
<i>Staphylococcus aureus</i>	Queimaduras e feridas infetadas; Infeções urinárias (cateteres)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Sepsis, infecções associadas a cateteres
<i>Staphylococcus mutans</i>	Gengivites e placa dentária
<i>Enterococcus</i> resistentes à vancomicina	Infeções nosocomiais

Os biofilmes formados em dispositivos médicos também são uma fonte contínua de infecção, necessitando, muitas vezes, da sua remoção completa do doente [65], [66]. As comunidades de bactérias organizadas em biofilme diferem das células planctónicas, uma vez que são entidades complexas e dinâmicas, representando uma tentativa de evolução pelas bactérias, para sobreviver face às pressões ambientais. Os biofilmes agravam o problema da resistência microbiana, sendo conhecidos por serem insensíveis aos antibióticos e microbicidas, que eliminariam as bactérias em suspensão [65], [66].

1.4.2.1. Formação de biofilmes

O processo que origina a formação de biofilmes é designado por *quorum-sensing* (QS) [65]-[67]. Os fenómenos de QS explicam a forma como as bactérias comunicam umas com as outras, na tentativa de em conjunto, levar à alteração da expressão génica, no interior da

população [65]-[67]. Nas bactérias Gram-negativas, pequenas moléculas, como as homoserina lactonas (AHLs), são as responsáveis pela comunicação entre bactérias [65]-[67]. Nas bactérias Gram-positivas, os péptidos autoindutores, que se ligam aos recetores de cinase de histidina, são os responsáveis por essa comunicação [65]-[67].

Na primeira etapa da formação de biofilmes, as células planctónicas localizam um substrato adequado para se fixarem e iniciarem o ciclo de crescimento (Figura 7) [65]-[67]. Esta adesão, inicialmente reversível, torna-se irreversível, uma vez que as bactérias começam a produzir uma substância exopolimérica (EPS). Esta substância é fundamental para a sobrevivência do biofilme e é composta por várias biomoléculas provenientes das bactérias e do ambiente circundante, servindo como uma barreira de defesa dos microrganismos contra os microbicidas, proporcionando um espaço fechado para o biofilme consolidar [65]-[67]. A maturação do biofilme verifica-se quando esta estrutura se torna tridimensional no espaço. Com o desenvolvimento contínuo do biofilme, a sua morfologia e topografia tornam-se distintas [65]-[67]. De seguida, ocorre a projeção de unidades do biofilme, a partir da biomassa inicial, que permite a máxima adsorção de nutrientes e eliminação de resíduos [65]-[67]. Além disso, a formação de cavidades ou canais ocultos ao longo do biofilme vai-se tornando evidente. Estas características estruturais conferem ao biofilme, um sistema de transporte, necessário para canalizar água e células planctónicas para toda a comunidade [65]-[67]. A última fase do ciclo de desenvolvimento do biofilme é o desprendimento de bactérias do biofilme que vão colonizar outros locais, que podem ser distantes do local inicial, e assim repetir o ciclo de desenvolvimento do biofilme. A produção de biofilme pode estar associada a estados de stress biótico ou ambiental [65]-[67].

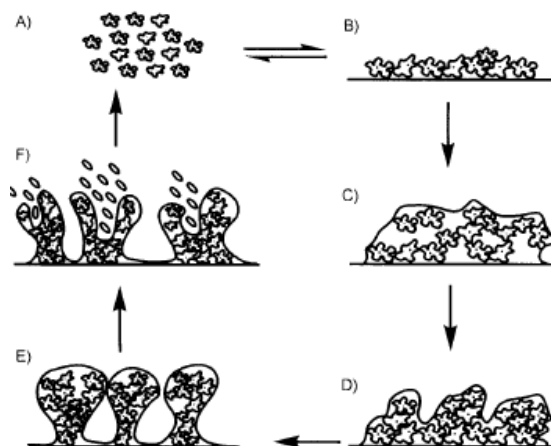


Figura 7: Ciclo de crescimento do biofilme: A) células planctónicas; B) adesão reversível a uma superfície; C) Início da secreção de EPS pelas bactérias, tornando a adesão irreversível; D) o biofilme maduro adquire estrutura tridimensional; E) Biofilme completamente maduro; F) Dispersão de bactérias do biofilme para colonizarem outras superfícies distantes (retirada de [65]).

1.4.2.2. Mecanismos de resistência do biofilme

Muitos dos mecanismos de resistência microbiana estão associados à formação de biofilmes, que proporcionam uma proteção para as bactérias em crescimento (Figura 8) [65], [66]. Os biofilmes são compostos por uma população heterogénea de células bacterianas que apresentam diferentes propriedades metabólicas [65], [66]. As células que são incorporadas nas camadas inferiores do biofilme podem crescer a um ritmo mais lento, devido à falta de nutrientes e oxigénio, em comparação com as células que se encontram à superfície do biofilme [65], [66]. A natureza do biofilme e a matriz de EPS podem intercalar alguns microbicidas, antes que estes possam efetivar os seus efeitos biológicos [65], [66]. Muitos dos agentes anti-microbianos não conseguem penetrar completamente o núcleo do biofilme, ficando presos na EPS ou por entrarem em contacto com as células resistentes, que impedem a penetração [65], [66]. A troca de material genético dentro do biofilme, através do processo de conjugação, pode ocorrer a taxas superiores a 100 vezes quando comparadas com populações de células planctónicas. Portanto, o desenvolvimento de mecanismos de resistência, tais como as bombas de efluxo, podem ser rapidamente propagadas a toda a comunidade do biofilme [65], [66]. Um dos problemas fundamentais no tratamento de infeções associadas a biofilmes é a alta taxa de infeções recorrentes, o que, muitas vezes resulta, num estado de doença mais agressivo (Figura 9) [65], [66]. Este problema é atribuído à existência de células ‘persistentes’, que se encontram na população de células do biofilme e também na população de células planctónicas, sendo inerentemente resistentes à ação de antibióticos ou microbicidas [65], [66]. No tratamento de doenças infecciosas, em que houve fixação de biofilme, verifica-se que os tratamentos iniciais, destinados a controlar a infeção, parecem ser bem-sucedidos com a eliminação de sintomas no doente [65], [66]. No entanto, quando as células ‘persistentes’ repovoam a comunidade, os métodos de tratamento são menos eficazes nas infeções subsequentes. Além disso, as células ‘persistentes’ não são erradicadas pela resposta imunitária do hospedeiro, porque se encontram protegidas pela matriz exopolimérica do biofilme [65], [66].

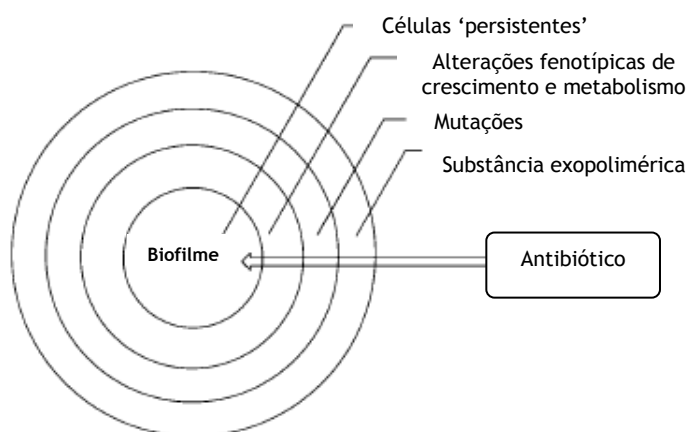


Figura 8: Diagrama conceptual dos mecanismos de resistência dos biofilmes (adaptado de [65]).

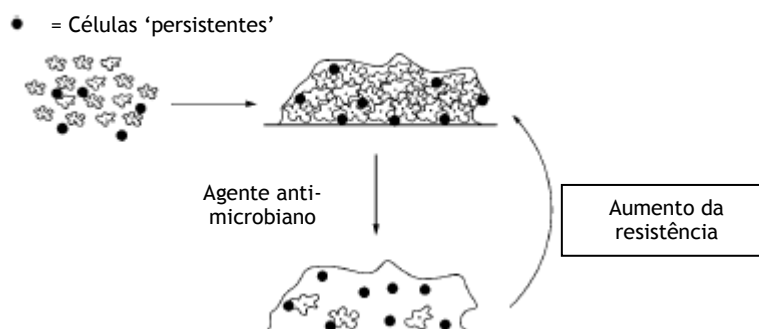


Figura 9: Presença de células 'persistentes' nos biofilmes (adaptada de [65]).

1.4.3. Compostos naturais como anti-microbianos

Tem-se verificado um aumento no estudo do potencial de fontes vegetais, microbianas e animais, para a produção de novas moléculas que possam ser a base para o desenvolvimento de fármacos antibacterianos [61]. As plantas têm recebido grande atenção como potenciais fontes de agentes antibacterianos, o que se traduz por um grande número de comunicações sobre a atividade antibacteriana *in vitro* de extratos de plantas, óleos essenciais e metabolitos secundários de plantas isolados e purificados, em conferências internacionais sobre Etnobiologia e Etnofarmacologia, e pelo elevado número de publicações nesta área [58], [68]-[76].

As razões para a grande popularidade de materiais vegetais prendem-se com a enorme biodiversidade dentro do reino vegetal, com o elevado número de espécies de plantas com flor estimado em mais de 300 000; pela produção de um grande número de metabolitos secundários, de baixo peso molecular, pelas plantas, e, pelo facto dos medicamentos derivados de plantas terem sido usados durante séculos em muitas partes do mundo para tratar uma grande variedade de doenças, incluindo infeções, presumindo-se que os indivíduos não iriam continuar a fazê-lo se não obtivessem nenhum benefício [61].

A elevada diversidade de compostos bioativos deve-se, em parte, aos mecanismos de defesa das plantas contra microrganismos, insetos, nematodes e até contra outras plantas [77]. O sistema de defesa das plantas previne eficazmente a maioria das infeções causadas por patógenos bacterianos ou fitopatogéneos. Estes têm estratégias comuns para infetar e colonizar hospedeiros vegetais e animais, nomeadamente, a capacidade de administrar proteínas efectoras nas células do hospedeiro e também a capacidade de mimetizar, suprimir ou modular as vias de sinalização de defesa do hospedeiro, melhorando a aptidão do patógeno [77]. Neste sentido, espera-se que algumas bactérias, que são normalmente patogénicas em animais, possuam suscetibilidade semelhante aos fitoquímicos, relativamente às bactérias patogénicas das plantas [77]. Os produtos químicos de defesa produzidos pelas plantas são geralmente classificados como fitoanticipinas, que são moléculas constitutivamente presentes numa forma inativa, ou como fitoalexinas, cujos níveis

umentam fortemente em resposta à invasão microbiana ou são sintetizadas em resposta a uma infecção [77]. As fitoanticipinas são produtos de baixo peso molecular que se encontram presentes nas plantas, antes do ataque por microrganismos, ou são produzidas a partir de componentes pré-existentes após ataque microbiano [77]. Estes fitoquímicos, tais como, os glucosinolatos, os glicósidos cianogénicos e os saponósidos, são normalmente armazenados como glicósidos menos tóxicos, nos vacúolos ou nas paredes celulares das células da planta [77]. Se a integridade da célula for quebrada, quando penetrada por um microrganismo, o glicósido entra em contacto com enzimas hidrolíticas, presentes noutros compartimentos da célula, libertando agliconas tóxicas [77]. As fitoalexinas são produtos de baixo peso molecular que são produzidas em resposta a ofensivas microbianas, ambientais ou de herbívoros [77]. Após a deteção de patógenos pelas plantas, é produzida uma mistura complexa de metabolitos secundários, de modo a controlar o invasor [77]. As fitoalexinas são quimicamente diferentes e incluem várias classes, tais como derivados fenilpropanóides simples, alcalóides, glicocorticóides, flavonóides, isoflavonóides, vários produtos de enxofre, terpenos e antraquinonas [77].

Os fitoquímicos com atividade antibacteriana reconhecida pertencem principalmente às seguintes classes estruturais de compostos: fenóis, terpenóides e óleos essenciais, alcalóides, lectinas e polipéptidos, e poliacetilenos [77].

1.4.4. Métodos de avaliação *in vitro* da atividade anti-microbiana

Do mesmo modo que a avaliação da atividade biológica é fundamental para a avaliação da suscetibilidade aos antibióticos, é igualmente necessária para o rastreio de novos agentes anti-microbianos [78]. Os produtos naturais, tais como, extratos de plantas, óleos essenciais ou compostos bioativos puros, constituem potenciais alternativas aos antibióticos convencionais. Por isso, encontram-se descritos vários métodos para a avaliação das suas propriedades anti-microbianas, sendo os resultados obtidos influenciados pelos microrganismos utilizados, pelos métodos de extração dos compostos bioativos e pelo grau de solubilidade dos mesmos [78]. Por forma a padronizar os procedimentos de avaliação da atividade anti-microbiana, o laboratório *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) elaborou protocolos normalizados para os métodos de diluição em agar e de microdiluição para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC) das amostras em estudo [78], [79]. Os métodos colorimétricos são uma abordagem alternativa, usando sais de *tetrazolium* como indicadores, uma vez que as bactérias os convertem em derivados de formazano com cor, que pode ser quantificada [78]. Apesar destes compostos serem bons indicadores do crescimento microbiano, apresentam algumas limitações, tais como, a autofluorescência, a redução dos sais de *tetrazolium* pelos compostos bioativos, especialmente no caso do XTT (3'-{1-[(phenylamino)-carbonyl]-3,4-tetrazolium}-bis (4-methoxy-6-nitro)benzene-sulfonic acid hydrate), TTC (2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride) e resazurina [78].

1.4.4.1. Teste da difusão em disco

O teste da difusão em disco é relativamente barato, fácil de usar e flexível, é um método baseado na difusão em agar, e que fornece resultados qualitativos. No entanto, o teste da difusão em disco é baseado na utilização de um gradiente de concentração do composto anti-microbiano relativamente instável, gerado a partir de uma fonte de difusão pontual central, ou seja, o disco [79]. Muitas variáveis *in vitro*, tais como, a densidade do inóculo, a fase de crescimento, e as variações na placa de agar (por exemplo, a profundidade) podem influenciar directamente os tamanhos da zona de inibição e portanto, dar resultados pouco fiáveis. Serão obtidas zonas de inibição maiores com o crescimento lento dos organismos fastidiosos em comparação com rápido crescimento de bactérias aeróbias [79].

1.4.4.2. Métodos para a determinação da Concentração Mínima Inibitória (MIC)

A Concentração Mínima Inibitória (MIC) é definida como a menor concentração dos compostos em estudo que inibe o crescimento visível dos microrganismos testados [79], [80]. A Concentração Mínima Letal (MLC), que no caso das bactérias se designa por Concentração Mínima Bactericida (MBC) é a menor concentração de um composto que mata a maioria (99,9%) do inóculo [79], [80]. Como a MIC se refere à capacidade de inibição, é possível que, caso o composto anti-microbiano seja removido, o microrganismo comece a crescer novamente [79], [80]. Para determinar a capacidade do composto anti-microbiano matar o microrganismo, pode ser realizado um ensaio de crescimento [79].

A determinação do valor de MIC pode ser realizada em agar ou em meio líquido. O método tradicional de determinação da MIC é utilizando a técnica de diluição em meio líquido, onde várias diluições do composto anti-microbiano são incorporadas no meio líquido, utilizando para isso os poços de microplacas ou tubos de ensaio. Cada tubo ou poço da microplaca contém uma concentração diferente do agente anti-microbiano e é inoculada com um valor fixo do microrganismo a ser testado. Após incubação adequada, a menor concentração que não revele crescimento visível é considerada como o valor de MIC [79]. O teste de diluição em agar é utilizado para a determinação do valor de MIC de um agente anti-microbiano necessária para inibir o crescimento de um microrganismo. Tal como acontece com técnica de diluição em meio líquido, o método de diluição em agar fornece um resultado quantitativo, sob a forma do valor de MIC, em contraste com os testes de suscetibilidade, baseados na difusão em disco, que resultam numa medida indireta de suscetibilidade e proporcionam um resultado qualitativo interpretativo. O método de diluição em agar é o que se encontra melhor estabelecido para determinar a suscetibilidade anti-microbiana e é comumente utilizado como padrão ou método de referência para a avaliação de novos agentes anti-microbianos [79].

Têm surgido, vários métodos de determinação dos valores de MIC, que utilizam corantes vitais, de modo a facilitar a interpretação dos resultados. Destes, destacam-se os que

utilizam a resazurina [81]. A resazurina é um corante redox de cor azul, que as bactérias metabolicamente ativas reduzem a resorufina (cor-de-rosa), e por fim a dihidroresorufina (incolor) [81].

1.4.4.3. Métodos de avaliação da atividade anti-biofilme

Os sistemas de formação de biofilmes baseados em microplacas estão entre os mais frequentemente usados [82]. Nestes sistemas, os biofilmes, ou são formados no fundo e nas paredes da microplaca (geralmente numa placa de 96 poços), ou são formados na superfície de um cupão colocado no fundo dos poços da microplaca (comummente em placas de 6 , 12 ou 24 poços) [82]. Após o crescimento do biofilme, a extensão da formação do mesmo ou a inibição da sua formação, por um determinado composto, pode ser medida por vários métodos [82]. O número de células cultiváveis pode ser determinado usando métodos de contagem em placa convencionais e, para isso, as células devem ser removidas da superfície por raspagem e/ou ultrassons (quando os biofilmes são formados na parte inferior e nas paredes da microplaca), ou podem ser separadas da superfície através da aplicação de ciclos de sonicação e vortex (quando os biofilmes são formados em cupões nos poços da microplaca) [82]. Subsequentemente, as células em suspensão podem ser plaqueadas. No entanto, os métodos de plaqueamento convencionais não permitem a recuperação de células viáveis mas não cultiváveis [82]. Outras técnicas alternativas têm sido desenvolvidas para a quantificação de biofilmes, formados em microplacas, e incluem: técnicas para determinar a biomassa total do biofilme (matriz exopolimérica, células vivas e mortas), por exemplo, a coloração com violeta de cristal; métodos para determinar o número de células aderidas viáveis, utilizando a resazurina ou o XTT; e técnicas para avaliar a quantidade de polímeros extracelulares da matriz do biofilme (coloração com azul de dimetilmetileno) [82].

1.5. Caracterização das plantas estudadas

O Parque Natural da Serra da Estrela abrange uma área montanhosa, localizada no centro-oeste do território português, repartida pelos concelhos de Celorico da Beira, Covilhã, Gouveia, Guarda, Manteigas e Seia, constituindo uma das mais extensas áreas protegidas nacionais [83]-[85]. O Parque foi criado em 16 de julho de 1976 (D.R. N.º 557/76), com uma área inicial de 52 000 hectares, tendo os seus limites sido redefinidos em revisões posteriores. Em 1979, a sua área foi ampliada para 101 060 hectares (D.R. N.º 167/79) e, mais recentemente, em 2007 (D.R. N.º 83/2007) sofreu uma redução para 88 850 hectares [83]-[85].

Pela sua posição latitudinal e pequena distância em relação ao oceano Atlântico, a Serra da Estrela está sujeita a influências climáticas mediterrânicas, atlânticas e continentais. Estes aspetos, em conjunto com a complexidade orográfica e geológica e com a ação do homem ao longo dos últimos séculos, determinam uma diversidade biológica elevada a nível da flora [83]-[85]. A variação altitudinal considerável desta montanha tem como consequência uma zonação bem marcada da vegetação. Assim, é possível definir três grandes andares de vegetação, basal, intermédio e superior, que podem ser caracterizados pela sua vegetação atual, potencial e respetivas etapas de substituição [83]-[85].

Da flora da Serra da Estrela fazem parte um pouco mais de 900 *taxa* de plantas vasculares, que representam cerca de um terço da fitodiversidade nacional, alguns deles endémicos da Serra tais como: *Festuca henriquessii*, *Silene foetida foetida* e outros de ocorrência restrita em Portugal, correspondentes a elementos florísticos Mediterrânicos, Atlânticos, Continentais, Alpinos e Boreais [83]-[85]. No Parque Natural da Serra da Estrela existem 32 habitats incluídos no Anexo I da Diretiva Habitats e cerca de um quarto das espécies de plantas descritas nesta área fazem parte da lista preliminar para o Livro Vermelho das plantas vasculares de Portugal [83]-[85].

Descrevem-se a seguir algumas espécies vegetais que ocorrem no Parque Natural da Serra da Estrela, e que foram objeto de estudo neste trabalho, no contexto da procura de novas substâncias com atividades antioxidante e anti-microbiana, assim como, as suas utilizações na medicina popular e as propriedades biológicas que se encontram estudadas.

1.5.1. *Echinopartum ibericum* (*E. ibericum*)

A espécie *E. ibericum* (Figura 10), conhecida vulgarmente por caldoneira, pertence ao género *Echinopartum*, da família *Fabaceae*. Esta espécie é endémica da Península Ibérica e cresce normalmente acima dos 1000 metros de altitude. São conhecidas outras espécies de caldoneira, tanto em Portugal como em Espanha, mas não se conhecem aplicações na medicina tradicional nem a sua composição química ou propriedades biológicas [86].



Figura 10: Fotografia da caldoneira na época da floração.

1.5.2. *Pterospartum tridentatum* (*P. tridentatum*)

A carqueja (Figura 11), cujo nome científico é *P. tridentatum*, é uma espécie autóctone que ocorre no norte da Península Ibérica e em Marrocos [87], [88]. Este pequeno arbusto cresce em solos ácidos até cerca de 100cm, e as suas flores amarelas características e de odor típico são tradicionalmente colhidas na primavera, de março a junho [87], [88]. As folhas e os caules são normalmente utilizados em culinária, para aromatizar arroz e carne assada [87], [88]. Os caules secos são também utilizados como combustível nos fornos de lenha tradicionais, dando um agradável aroma ao pão [87], [88]. Além disso, estudos recentes demonstraram a possibilidade deste arbusto ser utilizado como alternativa aos combustíveis fósseis, como fonte de açúcares convertíveis em bioetanol [89]. As flores da carqueja são utilizadas na medicina tradicional sob a forma de infusões, sozinhas ou em misturas de ervas, no tratamento de irritações da garganta, no controlo da glicémia (em casos de diabetes tipo 2), da hipertensão e da hipercolesterolemia [87], [88]. A infusão das flores está também indicada no alívio de problemas do fígado, bexiga, rins e reumatismo [88]. Este arbusto é também conhecido pelas suas propriedades diuréticas, laxantes, purgativas, emolientes e digestivas [90]. O óleo essencial das partes aéreas desta espécie, colhidas durante a fase de floração, é constituído maioritariamente por *cis-theaspirane* (13%), *trans-theaspirane* (12%) e octen-3-ol (11%) [88]. O extrato aquoso das flores de carqueja possui atividade antioxidante demonstrada pelos métodos do ABTS (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid)) e do β -caroteno/ácido linoleico, possuindo também grandes concentrações em fenóis totais [87]. Este extrato é constituído por uma mistura de compostos incluindo o ácido polioliquinico e derivados de ácidos gordos como sulfato de 12-hidroxijasmonato, ácido 5'-hidroxijasmónico e 5'-*O*-glucósido e outros compostos fenólicos [87]. Isto sugere que as flores da espécie *P. tridentatum* possuem fenóis de diferentes classes, nomeadamente, ácidos fenólicos, flavonas, flavonóis e isoflavonas [87].



Figura 11: Pormenor das flores amarelas da carqueja.

Relativamente às propriedades biológicas da carqueja, mostrou-se que o extrato aquoso das flores desta espécie, não afeta a fosforilação oxidativa nas mitocôndrias [87]. Além disso, estudaram-se as propriedades tóxicas destes extratos e verificou-se que os mesmos não apresentavam toxicidade para células hepáticas [87]. Outro estudo, com o objetivo de caracterizar a decocção de carqueja que é utilizada tradicionalmente, permitiu concluir que os principais constituintes do extrato aquoso são três derivados da genisteína (4',5,7-trihidroxi-isoflavona): as isoflavonas sissotrina, genistina e prunetina; a isoflavona 5,5'-dihidroxi-3'-metoxi-isoflavona-7'-*O*- β -glucósido também está presente [91]. Mostrou-se que as flores da carqueja têm atividade antioxidante em ambiente celular, para concentrações superiores a 0.3mg/mL, sendo o extrato desprovido de toxicidade para as células endoteliais [91], [92]. Verificou-se que existe uma relação entre a capacidade antioxidante dos extratos de carqueja com os potenciais efeitos benéficos nos doentes com diabetes, uma vez que o extrato aquoso desta espécie previne os danos oxidativos nas células endoteliais e assim atrasa o desenvolvimento de complicações vasculares [91], [92]. A atividade antioxidante deste arbusto foi amplamente estudada e relaciona-se com a sua composição em compostos fenólicos [90], [93].

1.5.3. *Juniperus communis* (*J. communis*)

A espécie *J. communis*, conhecida vulgarmente por zimbro (Figura 12), é uma gimnospérmica pertencente à família *Cupressaceae*, e corresponde a um arbusto que ocorre a alta altitude [94]. É o segundo género mais diverso das coníferas, com 67 espécies e 34 variedades. Todos os *táxons* estão restritos no hemisfério norte, exceto a espécie *J. procera* Hochst. Ex Endl., que também cresce ao longo das montanhas do rifte da África oriental, no hemisfério sul [95]. O zimbro prospera nas pastagens e nas falésias nas zonas montanhosas da Europa, Ásia, e América do Norte [95].

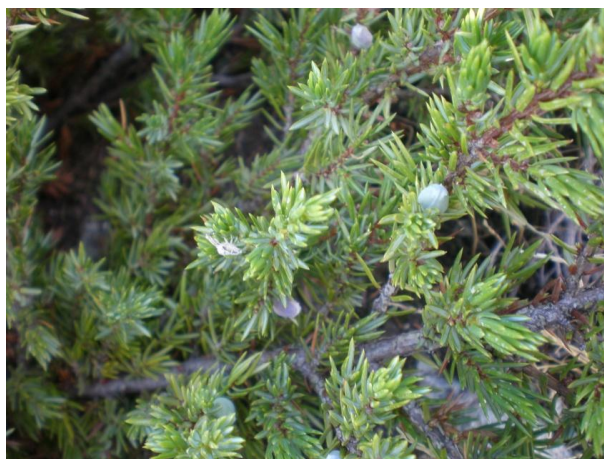


Figura 12: Fotografia do zimbro, mostrando as suas bagas.

Estão bem documentadas as propriedades medicinais desta espécie em casos de diarreia, dores abdominais, tumores, hemorroidas, bronquites e indigestão [94]. As bagas maduras do zimbro são tradicionalmente utilizadas como aromatizantes na confeção de alguns alimentos e na preparação de bebidas alcoólicas [94]. De acordo com a regulamentação europeia (EEC 1576/89), o sabor principal no tipo de gim mais comum e popular (*London dry gin*), que pertence à classe de “gins destilados”, provém das bagas do zimbro [96]. Estas contêm cerca de 2% de substâncias voláteis, juniperina, resinas (10%), proteínas, ácidos fórmico, acético e málico. Os frutos maduros secos contêm óleo essencial, também conhecido por óleo de zimbro, constituído por pineno, cadinenos, canfeno e outros ácidos diterpénicos [94]. Em fitoterapia, o óleo de zimbro tem sido utilizado como carminativo, diurético, inalado juntamente com vapor de água em casos de bronquite, em doentes com artrite e também como antioxidante [94]. Os óleos essenciais das agulhas, dos frutos e da madeira do zimbro foram objeto de vários estudos e as suas propriedades biológicas, tais como, anti-microbiana e citotóxica foram amplamente descritas e comprovadas [95], [97]-[101]. As bagas são também recomendadas no alívio da tosse, no tratamento da tuberculose infantil (demonstrou-se a atividade contra *Mycobacterium tuberculosis* [102], [103]) e na terapia de doentes diabéticos [94]. Estudou-se a atividade anti-microbiana de extratos desta espécie e verificou-se que estes apresentavam propriedades inibitórias em diversas estirpes que causam algumas doenças em humanos e em plantas [30], [94], [104]. Os extratos aquosos e etanólicos das folhas e das bagas do zimbro apresentaram atividade antioxidante medida por vários métodos e também capacidade de inibição da acetilcolinesterase [25], [30], [104].

1.5.4. *Ruscus aculeatus* (*R. aculeatus*)

A gilbardeira (*R. aculeatus*) (Figura 13) pertence à subfamília *Asparagoideae* da família *Liliaceae* (*Ruscaceae*) e é uma espécie amplamente distribuída pela Europa [105].



Figura 13: Fotografia da gilbardeira.

O extrato alcoólico dos rizomas desta espécie é normalmente utilizado no tratamento de problemas venosos ou como tônico e/ou preventivo vascular em casos de hemorroidas e fragilidade capilar [106], [107]. O extrato de *R. aculeatus* aumenta a circulação venosa periférica, causando contrações, pela ativação dos adrenoreceptores α_1 e α_2 , levando à libertação de norepinefrina endógena das terminações nervosas adrenérgicas, e pela ação direta na musculatura lisa venosa [108]. Além disso, os extratos também possuem atividade anti-elastase e são componentes de fármacos com atividade anti-inflamatória e vasoconstritora [109]. O efeito anti-edema de alguns heterósidos esteroides desta espécie foi também demonstrado em fenómenos edematosos [109]. A análise química permitiu verificar a presença de uma série de sapogeninas esteroides, saponinas, esteróis e triterpenos [105]. No geral, os compostos bioativos desta espécie são as saponinas esteroides, principalmente do tipo espirostando, incluindo as agliconas neoruscogenina e ruscogenina [110]. Estes compostos provêm da ciclização do 2,3-oxidossqualeno [111]. A atividade citostática de alguns compostos presentes nos rizomas desta espécie foi estudada em células de leucemia (HL-60) [105].

1.5.5. *Rubus ulmifolius* (*R. ulmifolius*)

A espécie *R. ulmifolius*, vulgarmente conhecida por silvas (Figura 14), pertence à família *Rosaceae* e tem sido utilizada para fins terapêuticos [112]. As folhas e os rebentos desta espécie são usados na medicina tradicional Italiana, devido às suas propriedades biológicas, nomeadamente, anti-inflamatória, antiodontálgica e espasmolítica gastrointestinal [112]; os rebentos jovens esmagados são aplicados em feridas e em picadas de insetos infetadas [112]. As folhas jovens esmagadas são aplicadas no tratamento de abscessos, furúnculos e úlceras; as decocções das folhas são utilizadas externamente na vermelhidão dos olhos, em lavagens vaginais, e internamente em casos de diarreia, hemorroidas e inflamações intestinais [113]. Na medicina popular Chilena, as silvas são utilizadas devido à sua atividade hipoglicemiante,

experimentalmente demonstrada em ratos [113]. Também se comprovaram as propriedades anti-microbianas de extratos metanólicos brutos das silvas em diversas bactérias e fungos [112], [114]. A atividade anti-microbiana de extratos de elevada polaridade, como por exemplo extratos metanólicos, de *R. ulmifolius* foi demonstrada em várias bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras, enquanto os extratos com n-hexano, clorofórmio, clorofórmio/metanol (9:1) são menos ativos [112]. A máxima atividade foi conseguida pelas frações contendo fenóis e taninos. As partes aéreas das silvas contêm compostos fenólicos, incluindo flavonoides (quercetina, caempferol, ácido cafeico e ácido clorogénico), ácidos gordos saturados e insaturados, e mostraram ter atividade antifúngica [112], [114]. Foram também identificados nesta planta, compostos como o ursano, oleanano, triterpenos e glicósidos de flavonoides; além disso a atividade anti-microbiana destes compostos puros e de frações ativas foi comprovada em diversos microrganismos, particularmente em estirpes de *S. aureus* multirresistentes [113], [114]. O estudo conduzido por Martini *et al*, 2009 [115] demonstrou a capacidade de extratos de *R. ulmifolius* inibirem o crescimento de estirpes de *Helicobacter pylori*, pela inativação das bombas iónicas, isto é, enzimas que regulam o fluxo de cobre e outros catiões de metais de transição através das membranas [115]. A atividade anti-microbiana dos extratos desta espécie em estirpes de patogéneos alimentares também foi estudada [116]. O trabalho de Quave *et al*, 2012 [117] permitiu concluir que o extrato das raízes de *R. ulmifolius*, rico em ácido elágico e outros derivados, pode ser utilizado na inibição da formação de biofilmes de estirpes de *S. aureus*, não exercendo atividade tóxica em células normais de mamíferos, o que sugere a possível aplicação deste extrato na prevenção e tratamento de infeções associadas a biofilmes de *S. aureus* [117], [118]. A atividade antioxidante de extratos de silvas e dos seus frutos, as amoras silvestres, encontra-se bem explorada e fundamentada cientificamente [43], [119], [120]. Esta atividade está relacionada com a presença de ácido cafeico, ácido ferúlico, ésteres quínicos cafeicos e também quercetina-3-O-glucoronido e caempferol-3-O-glucoronido [119]. A espécie Portuguesa de silvas tem sido amplamente estudada e as suas propriedades biológicas descritas, nomeadamente atividade antioxidante [120]-[122].



Figura 14: Pormenor das flores (à esquerda) e dos frutos (à direita) da espécie *R. ulmifolius*.

1.5.6. *Hakea sericea* (*H. sericea*)

A espécie *H. sericea* (*Proteaceae*) (Figura 15), também conhecida por carapeteiro ou háquea-picante, é uma espécie nativa do sudeste da Austrália, introduzida em Portugal para fins

ornamentais e que rapidamente se tornou numa espécie infestante. A sua capacidade de produzir raízes proteoides juntamente com a produção de um grande número de sementes, protegidas por folículos lenhosos que se acumulam pelos ramos durante toda a vida da planta, a eficiente dispersão das sementes pelo vento e a sua rápida germinação, permitiu que esta espécie se adaptasse a territórios sujeitos a incêndios e em solos pobres em fósforo. Estas vantagens tornaram a espécie *H. sericea* uma espécie invasora agressiva para a vegetação natural e autóctone da bacia do Mediterrâneo, à semelhança do que se observou na Nova Zelândia e na África do Sul [123], [124].



Figura 15: Fotografia da espécie *H. sericea*.

O estudo de Barr *et al*, 1988 [125], levou ao isolamento de 5-alkilresorcinóis, a partir de extratos das espécies *H. trifurcata* e *H. amplexicaulis* (ambas do género *Hakea*), com a capacidade de clivar moléculas de DNA [125]. Recentemente a espécie *H. sericea* tem recebido maior destaque, verificando-se que extratos desta planta apresentavam grandes concentrações de fenóis e flavonoides [126]. Mostrou-se também que os extratos polares de espécies de *Hakea* (*H. sericea* e *H. salicifolia*) têm boa atividade anti-microbiana em diversas estirpes de *S. aureus*, incluindo algumas multirresistentes [126].

1.5.7. *Cytisus multiflorus* (*C. multiflorus*)

A giesta-branca (*C. multiflorus*) (Figura 16), *Leguminosae-Cytiseae*, é uma espécie presente em torno do Mediterrâneo, apesar de ser encontrada em regiões geográficas distintas como o norte e o sul de África, a Europa ocidental e central, o Mar Negro e a Turquia [127]. Esta espécie, abundante na Península Ibérica, cresce em solos pobres e ácidos, aparece frequentemente em áreas degradadas ou marginais. Apresenta um grande número de flores brancas com um sistema de apresentação de pólen tipo valvular. A giesta-branca é muito utilizada para fins ornamentais, mas também para alimentação de gado. Outras aplicações desta planta incluem a recolha do pólen para fins de apicultura e a fertilização da terra para

a agricultura [127]. Este arbusto, e outros do mesmo género botânico, são conhecidos pelas suas propriedades bioativas, nomeadamente, antioxidante, diurética, hipnótica, ansiolítica e antiparasitária [93], [127]-[129]. Esta bioatividade, e em particular a atividade antioxidante, está relacionada com a elevada concentração de compostos fenólicos e flavonoides nesta espécie [93], [128], [129].



Figura 16: Giesta-branca florida.

1.5.8. *Crataegus monogyna* (*C. monogyna*)

A espécie *C. monogyna*, vulgarmente designada por pilriteiro ou espinheiro (Figura 17), é uma das espécies mais recomendadas na medicina popular e as suas bagas são abundantemente consumidas por pastores, caçadores e crianças, por serem consideradas saudáveis e nutritivas [130], [131]. O género *Crataegus* (*Rosaceae*) originário das zonas temperadas do hemisfério norte é composto por 280 espécies. Encontra-se no oeste Asiático, na América do Norte e na Europa, onde estão descritas 21 espécies. Para além da sua vasta utilização hortícola como espécie ornamental, é considerada uma das plantas medicinais mais antiga do mundo ocidental, estando inscrita em diversas farmacopeias [132]-[136]. A utilização disseminada desta planta relaciona-se com as suas propriedades neuro- e cardio-sedativas e à baixa toxicidade. A sua bioatividade está associada à presença de catequinas ((+)-catequina, (-)-epicatequina), proantocianidinas, flavonoides (hiperósido, vitexina-2''-*O*-ramnósido, vitexina-4'-acetil-2'-ramnósido, rutina e vitexina) e flavanóis [132], [133], [137].

A característica mais importante dos extratos desta espécie é o seu efeito inotrópico positivo, isto é, a capacidade de ativação das células do músculo cardíaco, regulando o fluxo de sangue, atuando como dilatadores coronários [138], [139]. Está amplamente descrita a atividade antioxidante de extratos de pilriteiro, que se deve à presença de inúmeros compostos fenólicos [24], [133], [138].



Figura 17: Flores (à esquerda) e frutos maduros (à direita) da espécie *C. monogyna*.

Em várias regiões de Portugal, o pilriteiro é considerado especialmente importante na prevenção de várias doenças relacionadas com a idade (doenças cardiovasculares, aterosclerose, artrite e hipertensão, por exemplo) [122]. Está também indicado no tratamento de constipações, infeções respiratórias superiores, pneumonias, bronquites e é utilizado como tranquilizante e no controlo das perturbações associadas à menopausa, obesidade e celulite [130]. As mulheres costumam reunir os frutos maduros outonais para darem às crianças, por acreditarem que são fortes suplementos vitamínicos [130]. Além disso, são também conhecidas aplicações das flores e dos frutos desta espécie no tratamento da insuficiência cardíaca crónica, na hipertensão arterial, em arritmias e em várias doenças gástricas bem como noutras aplicações geriátricas [130]. Os frutos do pilriteiro são por vezes utilizados, na confeção de compotas, doces, geleias, bebidas e licores [130]. Verificou-se que as flores desta espécie apresentam grandes teores de tocoferóis e ácido ascórbico. Os frutos maduros possuem maiores níveis de hidratos de carbono, β -caroteno e ácidos gordos saturados. Por sua vez, os frutos verdes, contêm maiores concentrações de ácidos gordos polinsaturados, assim como maiores quantidades de compostos fenólicos e melhor atividade antioxidante [130]. Mostrou-se a atividade anti-proliferativa de extratos das diferentes partes aéreas da espécie *C. monogyna*, devida essencialmente à presença de compostos fenólicos que modulam os eventos biológicos associados à progressão e desenvolvimento do cancro, tais como, proliferação celular, apoptose, diferenciação celular e neovascularização [140].

1.5.9. *Erica arborea* (*E. arborea*)

A espécie *E. arborea*, conhecida por urze-branca (Figura 18), pertence ao género *Erica* (*Ericaceae*), e encontra-se distribuída pela Europa, Médio Oriente e África. Esta espécie é nativa de uma série de países de África, Ásia e Europa; também é natural nas Ilhas Britânicas, Austrália e Nova Zelândia [141], [142]. Este arbusto pode atingir os 7 metros de altura e produz uma enorme quantidade de pequenas flores brancas. As suas folhas e flores têm sido utilizadas devido à sua ação adstringente, diurética, antisséptica urinária e laxante [141], [142]. Estão também indicadas na cicatrização de feridas e já Dioscorides indicava que um cataplasma preparado a partir das folhas de urze curava as mordidas de serpentes [142]. As espécies de *Erica* contêm inúmeros compostos bioativos, tais como, flavonoides, antocianidinas, cumarinas e triterpenoides [142]. Estudos fitoquímicos prévios levaram ao

isolamento de (-)-epicatequina, quercitrina e glicósidos flavónicos [141], [142]. As atividades farmacológicas desta espécie foram estudadas e demonstradas, tais como, anti-úlceras, anti-microbiana, anti-inflamatória, hipolipidêmica e citotóxica [142]-[144]. As propriedades antioxidantes de extratos desta espécie encontram-se também descritas e estão relacionadas com a presença de compostos fenólicos [93], [145], [146]. Além disso, o mel produzido a partir de pólen proveniente das flores de diferentes espécies de *Erica* possui atividades antioxidante e anti-microbiana [147], [148].

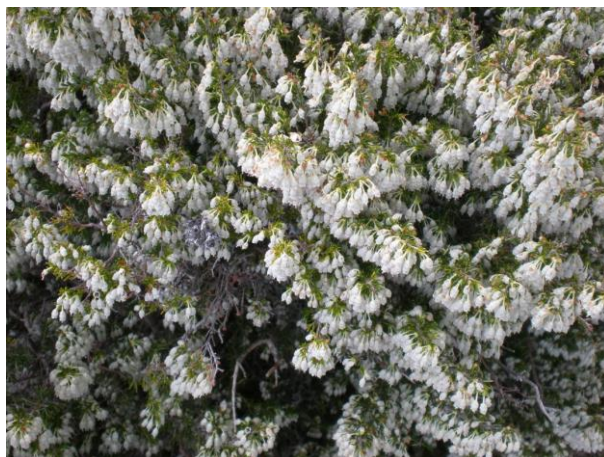


Figura 18: Urze-branca em flor.

1.5.10. *Ipomoea acuminata* (*I. acuminata*)

As flores popularmente chamadas por bons-dias ou glórias-da-manhã, de seu nome científico *I. acuminata* (Figura 19), pertencem ao género *Ipomoea*, a que também pertence a batata-doce, da qual se conhecem algumas propriedades biológicas [149]-[152]. Não se conhecem, no entanto, utilizações na medicina popular ou estudos fitoquímicos para esta espécie.



Figura 19: Pormenor da flor da espécie *I. acuminata*.

1.5.11. *Ailanthus altissima* (*A. altissima*)

A espécie *A. altissima* (*Simaroubaceae*) vulgarmente designada por árvore-do-céu (Figura 20) é nativa da China e foi introduzida na Europa no século XVIII [153], [154]. Apesar de inodoras, quando se encontram na planta, as folhas e as flores apresentam um odor desagradável quando são esmagadas [153], [154]. A espécie *A. altissima* encontra-se hoje amplamente naturalizada e adaptada a uma vasta variedade de tipos de solo. Esta planta é muito difícil de controlar e/ou remover, após ter criado uma raiz principal [153], [154]. Várias características contribuem para o sucesso da árvore-do-céu, nomeadamente, a versatilidade dos seus métodos de reprodução, o seu crescimento extremamente rápido, a tolerância a condições desfavoráveis e a provável ausência de aleloquímicos [153]. Esta árvore de folha caduca tem a capacidade de se regenerar a partir de rebentos diretamente da raiz, por isso é capaz de rapidamente colonizar outras áreas e assim tornar-se invasora [155]. Esta espécie é utilizada na medicina tradicional Chinesa como aromatizante amargo e no tratamento de constipações e doenças gástricas [153]. Estudos fitoquímicos prévios demonstraram a presença de quassinoides e alcaloides indólicos nesta planta, assim como, terpenoides, triterpenoides tetracíclicos, esteroides, flavonoides, cumarinas terpeniladas, e óleos voláteis [153], [156], [157]. Foram isolados e identificados vários quassinoides citotóxicos para células do hepatoma humano nesta espécie [158]. Também foram caracterizados os lípidos, ácidos gordos, fenóis e os compostos voláteis das folhas de *A. altissima* [153]. Extratos de *A. altissima* e os seus compostos isolados apresentaram propriedades medicinais, tais como, antioxidante, anti-malária, antiviral, antifúngica, inseticida, anti-tuberculose, anti-inflamatória, citotóxica, anti-proliferativa, anti-asmática e atividade inibitória da fosfodiesterase [153], [156]. As folhas desta espécie possuem elevada capacidade antioxidante, e antibacteriana em estirpes de bactérias Gram-positivas [156]. Os extratos metanólicos de *A. altissima* apresentaram atividade antibacteriana contra diferentes patogéneos alimentares e simultaneamente propriedades antioxidantes o que indica uma potencial utilização de extratos desta planta como conservantes alimentares [159]. Por outro lado, mostrou-se que extratos desta espécie induzem a apoptose em células cancerígenas [160] e além disso, inibem a expressão de citocinas inflamatórias, suprimindo a ativação do fator kappa-B nuclear, exercendo um efeito anti-anafilático [161]. O potencial papel de esta espécie, e a sua utilização como fibra alternativa para a produção de pasta para papel foi também avaliado [162], [163].



Figura 20: Fotografia da espécie *A. altissima*.

1.6. Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi melhorar o conhecimento sobre as atividades biológicas de extratos obtidos a partir de espécies vegetais presentes no Parque Natural da Serra da Estrela, e de definir procedimentos para a sua extração e valorização como produtos naturais para uso terapêutico e/ou nutracêutico. Assim, com este trabalho pretendeu-se:

1. Selecionar espécies que ocorrem na Serra da Estrela, e recolher as suas diversas partes aéreas (caules, folhas, flores e frutos);
2. Pesquisar a presença de compostos biologicamente ativos nas diferentes partes das espécies recolhidas:
 - a. Preparar extratos brutos a partir das diferentes partes das plantas, usando diferentes condições de extração (decoção e extração com o extrator de Soxhlet) e diferentes solventes (metanol, etanol, acetona e mistura água/etanol);
 - b. Estudar a composição química dos extratos, no que respeita a algumas classes de metabolitos secundários: fenóis, taninos, flavonoides e alcaloides;
 - c. Avaliar a bioatividade dos extratos brutos obtidos: atividade antioxidante, atividade anti-microbiana e atividade anti-biofilme;
 - d. Realizar testes de citotoxicidade para os extratos com melhores propriedades biológicas.
3. Separar e identificar os compostos responsáveis pelas atividades biológicas:
 - a. Separação cromatográfica através do fracionamento bioguiado dos extratos com melhores resultados, em termos de atividade biológica (maiores atividades antioxidante e anti-microbiana e baixa citotoxicidade), para obtenção de frações ativas e/ou para separar, isolar e identificar compostos puros;
 - b. Elucidação estrutural do(s) composto(s) maioritário(s), isolado(s) nas frações ativas, por FTIR, HRMS e NMR;
 - c. Avaliar as propriedades anti-microbianas do composto maioritário isolado e identificado.
4. Estudar a atividade anti-microbiana e anti-biofilme de alguns compostos puros (ácidos gálico, cafeico e clorogénico), identificados nos extratos vegetais por RP-HPLC:
 - a. Avaliar o mecanismo de ação, responsável pelas propriedades anti-microbianas, por citometria de fluxo e microscopia eletrónica de varrimento;
 - b. Analisar o efeito nas propriedades de adesão das bactérias ao polistireno.

2.1. Caracterização dos compostos bioativos com atividade antioxidante de extratos de alguns arbustos portugueses

Artigo 1

Bioactive Compounds, RP-HPLC Analysis of Phenolics, and Antioxidant Activity of Some Portuguese Shrub Species Extracts

Ângelo Luís, Fernanda Domingues, Ana Paula Duarte

Natural Product Communications, Vol. 6, No. 12, 1863 - 1872, 2011

NPC

Natural Product Communications

2011
Vol. 6
No. 12
1863 - 1872

Bioactive Compounds, RP-HPLC Analysis of Phenolics, and Antioxidant Activity of Some Portuguese Shrub Species Extracts

Ângelo Luís, Fernanda Domingues and Ana Paula Duarte*

CICS-UBI Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Av. Infante D. Henrique 6200-506 Covilhã, Portugal

apcd@ubi.pt

Received: August 12th, 2011; Accepted: October 24th, 2011

In the ecosystem of Serra Da Estrela, some plant species have the potential to be used as raw material for extraction of bioactive products. The goal of this work was to determine the phenolic, flavonoid, tannin and alkaloid contents of the methanolic extracts of some shrubs (*Echinopartum ibericum*, *Pterospartum tridentatum*, *Juniperus communis*, *Ruscus aculeatus*, *Rubus ulmifolius*, *Hakea sericea*, *Cytisus multiflorus*, *Crataegus monogyna*, *Erica arborea* and *Ipomoea acuminata*), and then to correlate the phenolic compounds and flavonoids with the antioxidant activity of each extract. The Folin-Ciocalteu's method was used for the determination of total phenols, and tannins were then precipitated with polyvinylpyrrolidone (PVPP); a colorimetric method with aluminum chloride was used for the determination of flavonoids, and a Dragendorff's reagent method was used for total alkaloid estimation. The 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and β -carotene bleaching tests were used to assess the antioxidant activity of extracts. The identification of phenolic compounds present in extracts was performed using RP-HPLC. A positive linear correlation between antioxidant activity index and total phenolic content of methanolic extracts was observed. The RP-HPLC procedure showed that the most common compounds were ferulic and ellagic acids and quercetin. Most of the studied shrubs have significant antioxidant properties that are probably due to the existence of phenolic compounds in the extracts. It is noteworthy to emphasize that for *Echinopartum ibericum*, *Hakea sericea* and *Ipomoea acuminata*, to the best of our knowledge, no phytochemical studies have been undertaken nor their use in traditional medicine been described.

Keywords: Phenolic compounds, flavonoids, antioxidant activity, vegetal extracts, RP-HPLC.

The Portuguese forest area occupies around 3.3 million hectares, which represents about 38% of the territory. The Serra Da Estrela Mountain supports a rich plant cover constituting the crown of Portugal's interior ecological network. In this ecosystem grow numerous species of trees and shrubs. Examples of shrubs that grow spontaneously in Portuguese forests in general and in this region in particular are *Echinopartum ibericum* Rivas Mart., Sánchez-Mata & Sancho, *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk subsp. *cantabricum* Spach, *Juniperus communis* L. subsp. *alpina* (Suter) Celak., *Ruscus aculeatus* L., *Rubus ulmifolius* Schott, *Hakea sericea* Schrader, *Cytisus multiflorus* (L'Hér) Sweet, *Crataegus monogyna* Jacq., *Erica arborea* L., and *Ipomoea acuminata* (Vahl) Roemer & Schultes (*I. indica* Burm.).

The genus *Echinopartum* (Spach) Fourr. (family Fabaceae), mostly endemic to the Iberian Peninsula, is composed of both silicicolous and calcicolous taxa, growing in mountain areas usually above 1000 meters above sea level [1]. The authors are not aware of any known application of these species in folk medicine.

Pterospartum tridentatum (Fabaceae; subfamily Papilionoideae) grows spontaneously in Portugal, where it

is known as Carqueja or Carqueija. The flowers are used in traditional medicine for the treatment of throat irritation conditions and in herbal mixtures for diabetes [2]. No phytochemical, pharmacological and toxicological studies have been reported for this species, but alkaloids and isoflavonoids are characteristic secondary metabolites of Fabaceae species [2].

Juniperus communis or common juniper is a coniferous shrub distributed throughout the Arctic and temperate zone of the northern hemisphere. Its dried bluish-black cones, known as "juniper berries", are said to stimulate the appetite and are used as a flavoring agent for culinary purposes and in the preparation of gin spirits [3]. They have also been used for various medicinal purposes, including as an abortifacient, contraceptive, diuretic, and as a remedy for urinary tract infections, chest complaints, diabetes, rheumatism and backache. More interestingly, juniper has been reported as a traditional cure for chest troubles such as bronchitis and for tuberculosis [3].

An alcoholic infusion of the rhizomes of *Ruscus aculeatus* has been used for the treatment of some venous ailments for decades [4].

Leaves and young shoots of *Rubus ulmifolius* are used in folk medicine for their anti-inflammatory, anti-odontalgic and gastrointestinal spasmolytic properties; crushed young shoots are applied to wounds, infected insect bites and pimples [5].

A key characteristic of *Hakea sericea* is its extreme serotinous habit: all of its seeds are retained in pairs in tough woody follicles, which accumulate along the branches throughout the life of the plant [6]. As far as we know, neither medicinal uses nor phytochemical studies are described to this shrub.

Cytisus spp. is used as a diuretic, hypnotic, sedative, anti-diabetic and also as a hepatoprotective [7].

Crataegus monogyna has been used as a folk medicine due its sedative actions, protective effects against arrhythmias and increase of coronary vessel flow [8]. Previous chemical studies on *C. monogyna* resulted in isolation of known flavonoids and phenolic acids [8].

Erica multiflora is used to treat hyperlipidaemia, and in folk medicine as a diuretic and antiseptic agent [9]. The phytochemical study of this plant showed that tannins, proanthocyanidols and flavonoids represent major compounds of its flowers [9].

Ipomoea species accumulate high levels of anthocyanin pigments in the storage root [10]. To the best of our knowledge, no medical applications are described for this plant.

Several constituents of plant extracts have been shown to have antioxidant activity, such as ascorbic acid, tocopherol, β -carotene, flavonoids, tannins, phenolics, and anthocyanins [11]. Oxidation is essential to many organisms for the production of energy to fuel biological processes. However, reactive oxygen species (ROS) are often over-produced under pathological conditions, resulting in oxidative stress. An over-production of various forms of activated oxygen species, such as free-radical and non-free-radical species is involved in the onset of many diseases such as cancer, cardiovascular diseases, rheumatoid arthritis, and atherosclerosis, as well as in degenerative processes associated with aging [11]. In order to reduce damage to the human body, synthetic antioxidants are used in industrial processing. However, the presence of unwanted side effects is almost unavoidable, and some have been suspected of being responsible for liver damage and carcinogenesis [11]. Thus, it is essential to develop antioxidants that can protect the human body from free radicals and retard the progress of many chronic diseases.

No single chemical component is responsible for the medicinal properties of plant-based drugs, and their synergic action or bioenhancement is due to the presence of several chemical substances in the plant material.

Therefore, the determination of the total amount of different classes of components is essential for the standardization of the plants [12].

The purpose of this work was to determine the phenolic, flavonoid, tannin and total alkaloid contents of the methanolic extracts of the species above mentioned, and then to correlate phenolic compounds and flavonoids with antioxidant activity of corresponding extracts. The Folin-Ciocalteu's method was used for the determination of total phenols, and tannins were then precipitated with polyvinylpyrrolidone (PVPP); a colorimetric method with aluminum chloride was used for the determination of total flavonoids, and a Dragendorff's reagent method was used for alkaloid estimation. A 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) method and a β -carotene bleaching test were used to assess the antioxidant activity of extracts. The identification of phenolic compounds present in extracts was performed using a RP-HPLC technique.

From the results presented in Table 1 it can be verified that fruits of *Juniperus communis* had a higher extraction yield than the other shrubs. By contrast, the extract of fruits of *Hakea sericea* produced the lowest extraction yield. The extraction yields obtained in the present study are very similar to those reported for some medicinal plants reported in the literature [13].

Medicinal plants are commonly rich in phenolic compounds, such as flavonoids, phenolic acids, stilbenes, tannins, coumarins, lignans and lignins. They have multiple biological properties including antioxidant activity. The antioxidant activity of phenolic acids and flavonoids is due to their redox properties, ability to chelate metals and quenching of singlet oxygen [14]. In this sense, it is reasonable to determine the amount of phenolic compounds in the extracts of these plants.

The quantitative determination of phenolic compounds using Folin-Ciocalteu's method is a widespread assay. [15]. As can be observed in Table 2, in general, the extracts from stems and leaves have the highest amount of phenolic compounds. The extract of stems of *Crataegus monogyna* is the one that had the greatest concentration of total phenols. This result is similar to those obtained by other researchers [16]. Barros *et al.* studied the composition and bioactivity of *Crataegus monogyna* and concluded that phenolics were the major antioxidant components present in this shrub [17]. *Ipomoea acuminata* and *Ruscus aculeatus* are species that are poor in these compounds. Many studies indicate that the roots of sweet potato (*Ipomoea batatas*) are a source of bioactive compounds [18]. In previous studies by our group, we concluded that the ethanolic extract of *Cytisus* spp. had more phenolics than that of the aqueous extract [19]. Methanolic extracts of the different parts of *Cytisus multiflorus* have significant amounts of total phenols. *Pterospartum tridentatum* and *Erica arborea* are also species rich in these compounds. Fruits of *Rubus*

Antioxidant activity of Portuguese shrub extracts

Natural Product Communications Vol. 6 (12) 2011 1865

Table 1: Extraction yields of methanolic extracts.

Species	Plant part	Extraction yield (%) *
<i>Echinopartum ibericum</i>	Stems and Leaves	21.1 ± 0.1
	Flowers	19.7 ± 0.4
<i>Pterospartum tridentatum</i>	Stems and Leaves	26.1 ± 1.7
	Flowers	25.1 ± 1.4
<i>Juniperus communis</i>	Stems	15.6 ± 2.1
	Leaves	31.4 ± 2.0
	Fruits	45.7 ± 4.8
<i>Ruscus aculeatus</i>	Stems and Leaves	18.3 ± 3.5
	Stems	9.9 ± 1.0
<i>Rubus ulmifolius</i>	Leaves	23.8 ± 5.6
	Flowers	22.6 ± 0.7
	Fruits	27.5 ± 2.1
<i>Hakea sericea</i>	Stems	11.0 ± 0.1
	Leaves	16.4 ± 2.4
	Fruits	3.2 ± 0.1
<i>Cytisus multiflorus</i>	Stems	10.1 ± 0.6
	Leaves	15.5 ± 1.5
	Flowers	27.6 ± 2.7
	Fruits	25.0 ± 1.1
<i>Crataegus monogyna</i>	Stems	13.1 ± 1.7
	Leaves	23.1 ± 3.1
	Flowers	23.5 ± 9.9
	Fruits	10.2 ± 1.5
<i>Erica arborea</i>	Stems	12.9 ± 0.1
	Leaves	29.5 ± 1.8
	Flowers	38.6 ± 0.7
<i>Ipomoea acuminata</i>	Stems	9.3 ± 1.7
	Leaves	12.0 ± 0.3
	Flowers	14.4 ± 5.4

* Results in terms of mean ± standard deviation

ulmifolius are the part of this shrub that has less phenolic compounds, in contrast with stems, leaves and flowers. Other studies [20] demonstrated that this shrub had a lower concentration of phenols that the one now estimated. There are no literature data for *Echinopartum ibericum* and *Hakea sericea* phenol contents, but in this work they were shown to be rich in these compounds. Öztürk *et al.* conducted an exhaustive study of several species of Turkish juniper, and concluded that *Juniperus communis* is rich in bioactive compounds, and that methanol is one of the best solvents for their extraction [21]. Regarding the determination of tannins (Table 2), it can be concluded that the composition varies in the different extracts (it was not possible to observe a trend). Significant differences were also found in the tannin content among different parts of the same shrub, which is in agreement with the behavior described for tannins in plants.

Flavonoids are polyphenolic compounds that occur ubiquitously in plants and structurally have variations in one of the aromatic rings that characterize the different types, namely, flavonols, flavones, isoflavones, flavonones, flavanol and anthocyanins [14,22]. Flavonoids could act as antioxidants because they can readily donate an electron or a hydrogen atom to a peroxy or alkoxy radical to terminate a lipid peroxidation chain reaction or to regenerate a phenolic/flavonoid compound, which can effectively chelate a pro-oxidant transition metal [22]. The process used in quantitative methods for flavonoid determination is performed by precipitating them with aluminum chloride in an alkalized medium. This precipitate acquires a color and, therefore, lends itself to the colorimetric assay. The flavonoids in the presence of

aluminum chloride have an intense yellow fluorescence when observed under filtered UV light [23]. As can be seen in Figure 1, extracts from flowers and fruits generally have more flavonoids than the extracts of stems and leaves of the same shrub species. However, *Ipomoea acuminata* had the highest flavonoids content of the tested species, especially the extract of leaves. The results obtained for the studied species are very similar to those of our previous studies for other Portuguese shrubs [19]. Andrade *et al.*, have studied the bioactivity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts, and the flavonoids contents were very similar to those presented here [24]. In the present study, *Erica arborea*, *Cytisus multiflorus*, *Rubus ulmifolius* and *Pterospartum tridentatum* are noted for being species with large concentrations of flavonoids. There are no previous studies in the literature about *Hakea sericea* and *Echinopartum ibericum* on the characterization of flavonoids; however, large amounts of these compounds were detected in all these species. Previous research on flavonoids of various species of juniper showed that this shrub could be a source of these biologically active compounds [25]. The results now obtained showed that the leaves of this species are the richest part of the plant in these compounds. Methanol was shown to be a good solvent for flavonoids, as its high polarity favors the extraction of compounds with aromatic rings possessing hydroxyl groups.

Alkaloids are responsible for the therapeutic effect of many plant materials, but several alkaloids are toxic. Over 200 alkaloids have been identified in 300 plant species of up to 13 families. It has been estimated that up to 3% of the world's flowering plants contain toxic alkaloids [26]. The alkaloids were precipitated as BiI₃(Alk·HI) by Dragendorff's reagent (KBiI₄). Bismuth forms a yellow bismuth complex {Bi[CS(NH₂)₃]}(NO₃)₃ in nitric acid medium with thiourea. The bismuth from the alkaloidal complex is completely released by disodium sulfide [12].

Looking at Figure 1 it could be noted that all studied extracts have significant amounts of alkaloids. *Cytisus multiflorus* is the richest species in these compounds, specially the extracts of the stems. This species is known to possess alkaloids, namely spartein, with anti-arrhythmic properties [7]. The extract of leaves of *Ipomoea acuminata* also has a high concentration of alkaloids. By contrast, *Juniperus communis* is the poorest species in alkaloids. The extract of the leaves of that shrub is the one that has the smallest concentration of alkaloids.

One problem in assessing antioxidant activity is that this activity is variable and depends on the method used. It is known that an antioxidant mechanism in various biological matrices is very complex and several factors may intervene [27]. Given this complexity, only one method to determine the antioxidant activity of the extracts is not sufficient to draw relevant conclusions, and thus, we have applied two different methods and determined diverse antioxidant properties.

Table 2: Total phenolic compounds and tannin contents of methanolic extracts.

Species	Plant part	Total phenolic compounds (mg GAE / g dry matter) *	Tannin content (mg GAE / g dry matter)
<i>Echinopartum ibericum</i>	Stems and Leaves	99.1 ± 1.5	26.3
	Flowers	71.9 ± 0.8	N/D
<i>Pterospartum tridentatum</i>	Stems and Leaves	113.6 ± 1.5	43.4
	Flowers	171.4 ± 0.7	55.3
<i>Juniperus communis</i>	Stems	221.3 ± 2.5	79.3
	Leaves	155.6 ± 3.2	60.4
<i>Ruscus aculeatus</i>	Fruits	44.7 ± 2.6	N/D
	Stems and Leaves	32.9 ± 0.3	N/D
<i>Rubus ulmifolius</i>	Stems	186.8 ± 3.8	0.5
	Leaves	167.6 ± 6.1	21.9
	Flowers	291.4 ± 0.4	132.7
<i>Hakea sericea</i>	Fruits	54.5 ± 0.6	6.8
	Stems	267.6 ± 5.9	74.8
	Leaves	217.0 ± 2.7	103.5
<i>Cytisus multiflorus</i>	Fruits	110.1 ± 2.7	N/D
	Stems	142.4 ± 2.0	11.1
	Leaves	176.1 ± 3.6	61.5
<i>Crataegus monogyna</i>	Flowers	120.4 ± 0.9	21.1
	Fruits	155.1 ± 5.6	20.6
	Stems	377.4 ± 4.5	134.0
<i>Erica arborea</i>	Leaves	225.5 ± 2.5	81.1
	Flowers	186.2 ± 2.7	86.5
	Fruits	55.3 ± 2.7	N/D
<i>Ipomoea acuminata</i>	Stems	270.2 ± 4.3	133.8
	Leaves	260.2 ± 1.9	92.5
	Flowers	178.1 ± 0.2	83.0
<i>Crataegus monogyna</i>	Stems	23.5 ± 5.1	N/D
	Leaves	32.2 ± 1.3	N/D
	Flowers	84.3 ± 1.7	N/D

* Results in terms of mean ± standard deviation; N/D – Not detected.

Results for the DPPH radical scavenging assay are reported as IC₅₀ values, which are defined as the amount of antioxidant required to inhibit 50% of DPPH free radicals under the experimental conditions [28]. Table 3 shows that *Echinopartum ibericum*, *Ruscus aculeatus* and *Ipomoea acuminata* had the poorest antioxidant activity in this assay, whereas that of stems of *Crataegus monogyna* had both the greatest concentration of total phenols and, simultaneously, the greatest antioxidant activity. In contrast, *C. monogyna* fruits had only moderate antioxidant activity. Other researchers demonstrated that the ethanolic extract of berries of *C. monogyna* possessed DPPH free-radical-scavenging activity [29]. All *Erica arborea* and *Hakea sericea* extracts had very strong antioxidant activity. As far as we know, no medicinal uses are described for this latter shrub and no previous phytochemical studies have been carried out on it, but it is rich in phenols with antioxidant activity. The results obtained for the parameters of antioxidant activity for the standard compounds are very similar to those determined by the same method by Faustino *et al.*, and Scherer and Godoy [30,31].

The β-carotene/linoleic acid bleaching assay is one of the antioxidant assays suitable for plant samples [28,32]. All the shrub extracts tested presented some degree of antioxidant properties when compared with the synthetic antioxidant BHT. The extracts of *Echinopartum ibericum* (Figure 2) showed a high degree of inhibition of lipid oxidation (linoleic acid) and sequestration of radicals

resulting from its possible oxidation, when compared with the extracts of *Pterospartum tridentatum* and *Hakea sericea* (Figure 2).

In contrast with the results of the DPPH scavenging assay, the extracts of *Echinopartum ibericum* had no significant ability to sequester free radicals such as DPPH, but displayed a high degree of inhibition of lipid oxidation, which may predict a potential use as a food antioxidant. The extract of *Pterospartum tridentatum* flowers showed the weakest inhibition of lipid oxidation. *Rubus ulmifolius* (Figure 3) showed the highest antioxidant potential measured by this method. By contrast, *Ipomoea acuminata* (Figure 3) had no capacity to promote inhibition of lipid oxidation. Stems of *Juniperus communis* (Figure 4) is the part of this shrub that provided higher percentages of inhibition, and the extracts of leaves and fruits presented antioxidant activity similar to that of the extract of *Ruscus aculeatus* (Figure 4).

Other studies [21] undertaken with juniper species allow us to conclude that in the β-carotene-linoleic acid assay, oxidation of linoleic acid was effectively inhibited by methanol extracts of various species of *Juniperus*, which is in agreement with the results now obtained. *Erica arborea*, *Cytisus multiflorus* and *Crataegus monogyna* were grouped in the same graph (Figure 5) because they have very similar antioxidant activity. It should be noted the extract of flowers of *Cytisus multiflorus* (Figure 5) presented percentages of inhibition slightly higher than those of the other extracts.

According to Figure 6, there was a positive linear correlation between antioxidant activity index and total phenolic content of methanolic extracts (R²=0.8442). These results indicate that the phenolic compounds could be the main contributor to the antioxidant properties of these shrubs. This result is in agreement with several previous studies [19,33]. For example Fu *et al.* studied the antioxidant activity and phenolic compounds of 56 wild fruits from South China and found that the results showed a positive linear correlation between the antioxidant capacities and total phenolic content (R²>0.86) [33]. The same analysis was conducted for the flavonoids (Figure 6) and it was verified that there was no correlation (R²=0.0083) between these compounds and the antioxidant activity of the extracts. It is known that only flavonoids of a certain structure and particular hydroxyl position in the molecule determine the antioxidant properties; in general these properties depend on the ability to donate either hydrogen or an electron to a free radical [34].

RP-HPLC analysis was employed to identify major phenolic compounds in the methanolic shrub extracts. Satisfactory separation with good resolution could be achieved with the method now used. Such data will be helpful to compare the antioxidant activities with the

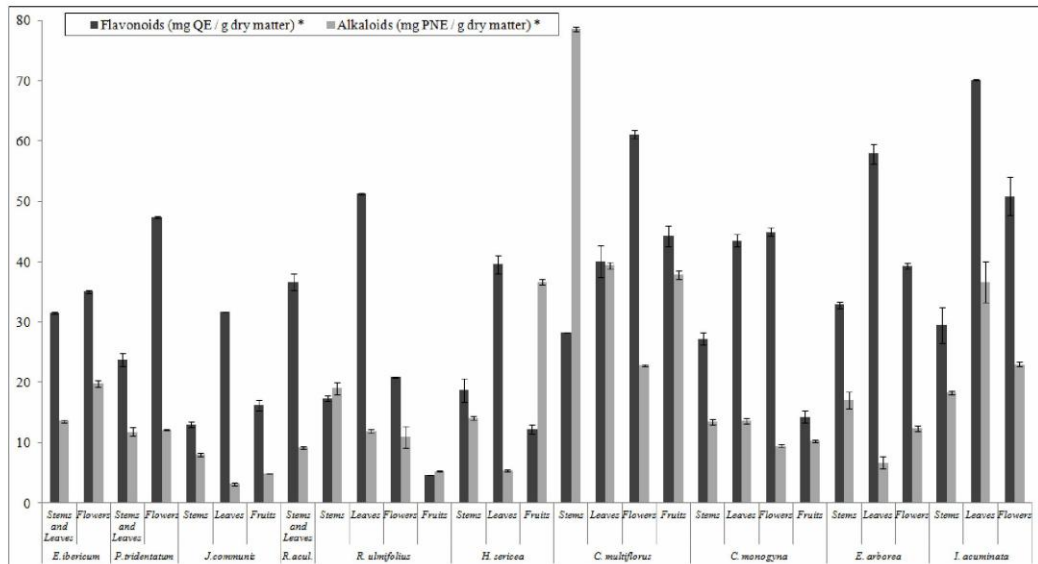


Figure 1: Concentration of flavonoids and alkaloids in studied extracts (* Results in terms of mean ± standard deviation).

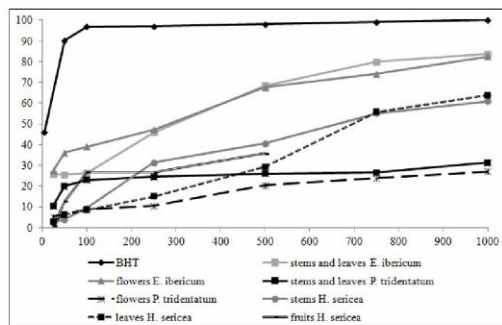


Figure 2: Antioxidant activity of the extracts of *Echinopsium ibericum*, *Pterospartum tridentatum* and *Hakea sericea* measured by β -carotene bleaching test.

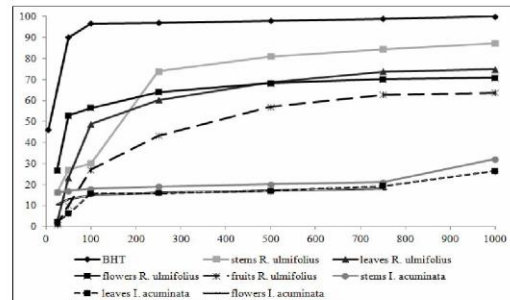


Figure 3: Antioxidant activity of the extracts of *Rubus ulmifolius* and *Ipomoea acuminata* measured by β -carotene bleaching test.

phenolic compounds of the different studied shrubs and will be also useful to understand their chemical constituents and functionality. RP-HPLC analysis is the most used method to identify plant phenolics. Because of the diversity and complexity of natural phenolic compounds in hundreds of medicinal plant extracts, it is rather difficult to characterize every compound and elucidate its structure. It is not difficult, however, to identify major categories of phenolic compounds and representative phenolics. In the present study, we identified representative phenolic compounds from selected plants. A total of nine phenolic compounds were identified and quantified in the methanolic extracts of the shrubs (Table 4), including hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids and flavonoids. The total amount

of phenolic compounds in all the extracts was 1380.8 mg/g of dry matter. Gallic acid is one of the most important hydroxybenzoic acids, but, surprisingly, in the extracts now analyzed, it was present in low amounts (1.26%). However, the hydroxycinnamic acids identified (caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid) were abundantly present. Ferulic acid was the most dominant hydroxycinnamic acid, taking a percentage of occurrences of 29.0 %. These results concerning phenolic acids are in agreement with previously published data for other biological samples [35]. Ellagic acid and quercetin are also present in large amounts, with percentages of occurrence of 17.9% and 13.7%, respectively. Vanillic acid is the phenolic compound that is present in greater quantity in the extract of the stems and leaves of *Pterospartum tridentatum*, having a concentration of 32.2 mg/g of dry matter, corresponding to a percentage of 27.6 %. *Juniperus*

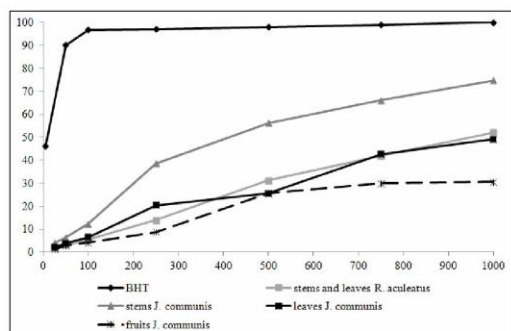


Figure 4: Antioxidant activity of the extracts of *Ruscus aculeatus* and *Juniperus communis* measured by β -carotene bleaching test.

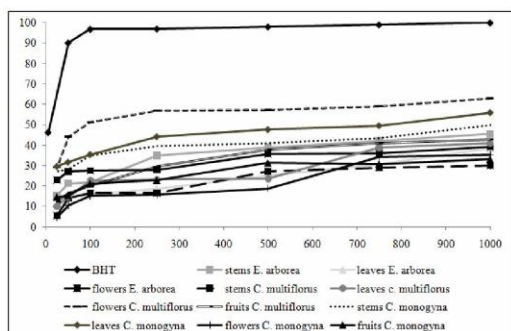


Figure 5: Antioxidant activity of the extracts of *Erica arborea*, *Cytisus multiflorus* and *Crataegus monogyna* measured by β -carotene bleaching test.

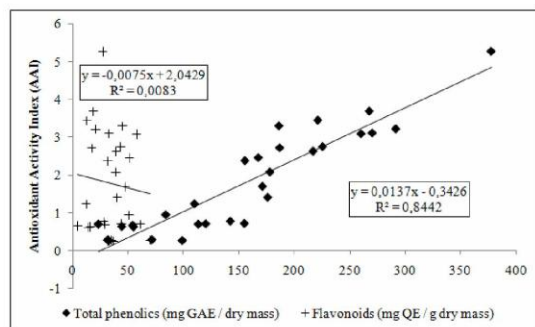


Figure 6: Correlation between antioxidant activity and total phenolics and flavonoids of extracts.

communis, *Ruscus aculeatus*, *Hakea sericea* and *Ipomoea acuminata* are species relatively poor in phenolic compounds. A total of 34.5% of the analyzed phenols of the extract of *Rubus ulmifolius* leaves correspond to ferulic acid, with a concentration of 18.5 mg/g dry matter. In the extract of fruits of the same species, chlorogenic acid is the predominant compound. *Cytisus multiflorus* is rich in ferulic acid and ellagic acid, especially its leaves, flowers and fruits. The extract of stems of *Erica arborea* presents a large amount of ferulic acid, while the extracts of flowers

Table 3: Antioxidant properties of methanolic extracts studied and standard compounds.

Species / Standard	Plant part	IC ₅₀ (mg/L) *	AAI *	Antioxidant Activity
<i>Echinopartum ibericum</i>	Stems and Leaves	162.7 ± 13.8	0.3 ± 0.02	Poor
	Flowers	125.3 ± 12.4	0.3 ± 0.02	Poor
<i>Pterospartum tridentatum</i>	Stems and Leaves	69.7 ± 11.9	0.7 ± 0.06	Moderate
	Flowers	26.1 ± 1.3	1.7 ± 0.06	Strong
<i>Juniperus communis</i>	Stems	12.4 ± 0.3	3.4 ± 0.07	Very Strong
	Leaves	16.8 ± 0.6	2.4 ± 0.07	Very Strong
	Fruits	81.1 ± 6.9	0.6 ± 0.05	Moderate
<i>Ruscus aculeatus</i>	Stems and Leaves	171.9 ± 21.1	0.3 ± 0.03	Poor
	Stems	14.7 ± 1.2	2.7 ± 0.2	Very Strong
<i>Rubus ulmifolius</i>	Leaves	17.3 ± 1.2	2.5 ± 0.4	Very Strong
	Flowers	11.0 ± 0.5	3.2 ± 0.2	Very Strong
	Fruits	78.8 ± 5.9	0.7 ± 0.04	Moderate
<i>Hakea sericea</i>	Stems	9.5 ± 0.1	3.7 ± 0.03	Very Strong
	Leaves	13.4 ± 0.4	2.6 ± 0.06	Very Strong
	Fruits	28.3 ± 1.8	1.2 ± 0.07	Strong
	Stems	64.9 ± 3.2	0.8 ± 0.05	Moderate
<i>Cytisus multiflorus</i>	Leaves	35.1 ± 1.4	1.4 ± 0.05	Strong
	Flowers	71.5 ± 8.8	0.7 ± 0.09	Moderate
	Fruits	77.0 ± 8.6	0.7 ± 0.07	Moderate
<i>Crataegus monogyna</i>	Stems	8.5 ± 0.2	5.3 ± 0.1	Very Strong
	Leaves	16.5 ± 0.3	2.7 ± 0.05	Very Strong
	Flowers	13.6 ± 0.2	3.3 ± 0.05	Very Strong
	Fruits	86.5 ± 12.5	0.6 ± 0.06	Moderate
<i>Erica arborea</i>	Stems	14.6 ± 1.5	3.1 ± 0.3	Very Strong
	Leaves	10.9 ± 0.1	3.1 ± 0.04	Very Strong
	Flowers	16.1 ± 0.7	2.1 ± 0.1	Very Strong
<i>Ipomoea acuminata</i>	Stems	77.3 ± 6.0	0.7 ± 0.06	Moderate
	Leaves	204.1 ± 12.8	0.3 ± 0.09	Poor
Rutin	---	10.7 ± 0.4	4.9 ± 0.2	Very Strong
Quercetin	---	4.3 ± 0.4	12.2 ± 1.7	Very Strong
Trolox	---	8.4 ± 0.1	6.6 ± 0.1	Very Strong
Galic Acid	---	2.2 ± 0.02	22.8 ± 0.3	Very Strong

* Results in terms of mean ± standard deviation

are rich in ellagic acid. The extract of *Crataegus monogyna* flowers has the greatest concentration of ferulic acid (116.8 mg/g, dry matter), which corresponds to a percentage of 75.7%, relatively to the total phenolics quantified in this extract.

Experimental

Plant material: Aerial parts (stems, leaves, flowers and fruits) of *Echinopartum ibericum*, *Pterospartum tridentatum*, *Juniperus communis*, *Ruscus aculeatus*, *Rubus ulmifolius*, *Hakea sericea*, *Cytisus multiflorus*, *Crataegus monogyna*, *Erica arborea* and *Ipomoea acuminata* were collected in Serra Da Estrela. Table 5 shows the GPS coordinates and altitude at which the different shrubs were collected. Plant materials were dried at 35°C in a ventilated oven during 48 h and reduced to coarse powder (< 2 mm) using a laboratory cutting mill. Harvesting, transport and storage of plant species were authorized by *Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade*. All vegetal species were identified by a botanist and a voucher specimen of all species used has been deposited in the Herbarium of the *Instituto Superior de Agronomia (Jardim Botânico d'Ajuda, Lisboa)*. Table 5 lists the full scientific name of the vegetal species and the number of the voucher specimens.

Extraction process: Methanolic extracts were obtained using a Soxhlet apparatus until the solvent became colorless, using approximately 100 g of raw material and 1 L of solvent. The extracts were filtered under vacuum

using a crucible of porosity #2 then distilled under vacuum to remove the solvents to a final volume of 100 mL. Then, 5 mL of each extract was diluted in 45 mL of methanol. Aliquots (5 mL) of the extracts were removed for subsequent evaporation to dryness for the calculation of extraction yield and extract concentration.

Determination of total phenolic compounds: The phenols were determined by Folin-Ciocalteu's colorimetric method. The methanolic solutions of each extract (50 µL) or gallic acid (standard phenolic compound) were mixed with 450 µL of distilled water, and then 2.5 mL of Folin-Ciocalteu's reagent 0.2 N (diluted with distilled water) was added. The mixtures were allowed to stand for 5 mins, and then 2 mL of aqueous Na₂CO₃ (75 g/L) was added. After incubation of these reaction mixtures (90 mins / 30°C), the total phenols were determined by colorimetry at 765 nm. The standard curve was prepared using 500, 400, 350, 325, 300, 250, 225, 200, 150, 125, 100 and 50 mg/L solutions of gallic acid in methanol ($y=0.0009x$; $R^2=0.9875$). Total phenol values were expressed as gallic acid equivalents (mg GAE / g of dry mass) [36,37]. The assays were conducted in triplicate.

Tannin content: Tannins were measured as the difference in total phenolics (measured by Folin-Ciocalteu's reagent) before and after treatment with insoluble polyvinylpyrrolidone (PVPP), as this polymer binds strongly to tannins [38]. About 1 mL of each methanolic extract was added to 1 mL of an aqueous solution of PVPP (70 mg/mL). After vigorous shaking, the samples remained for 15 mins at 4°C, to develop the tannin-PVPP complex [39,40]. Then the samples were centrifuged for 10 mins at 3000 rpm; the tannins were found in the residue and the free phenols/non-adsorbed phenolics in the supernatant. Total phenols in the supernatant were determined by the Folin-Ciocalteu colorimetric method, as described above, and the concentration of tannins was calculated as the difference between the total phenols and free phenols, and is expressed in their respective units [39,40]. These determinations were made in triplicate.

Flavonoids determination: The aluminum chloride colorimetric method was used for flavonoids determination according to Pourmorad *et al.* [37]. Each methanol extract (500 µL) was separately mixed with 1.5 mL of methanol, 0.1 mL 10 % aluminum chloride, 0.1 mL of 1 M potassium acetate, and 2.8 mL of distilled water. This solution remained at room temperature for 30 mins; the absorbance of the reaction mixture was measured at 415 nm using a spectrophotometer. The calibration curve was constructed by preparing 8 quercetin solutions at concentrations ranging from 12.5 to 200 µg/mL in methanol ($y=0.0074x$; $R^2=0.9980$). Total flavonoid values were expressed as quercetin equivalents (mg QE / g of dry mass) [36]. These determinations were made in duplicate.

Alkaloid estimation: The alkaloid estimation was performed by a spectrophotometric method, as described

by Sreevidya and Mehotra [12]. Briefly, 10 mL of each crude extract was centrifuged for 10 mins (3000 rpm) to remove residual suspended particles and then 5 mL of the supernatant was mixed with 1 mL of HCl, 0.1 N. Then, 2.5 mL of Dragendorff's reagent was added to the previous mixture, for precipitation and the precipitate was centrifuged for 5 mins (3000 rpm). This precipitate was further washed with 2.5 mL of ethanol. The filtrate was discarded and the residue was then treated with 2.5 mL of disodium sulfide solution (1%, w/v). The brownish black precipitate formed was then centrifuged (5 mins, 3000 rpm). This residue was dissolved in 2 mL of concentrated nitric acid, with warming, if necessary; this solution was diluted to 10 mL in a standard flask with distilled water and 1 mL was then pipetted out and mixed with 5 mL of thiourea solution (3%, w/v). The absorbance of this solution was measured at 435 nm against a blank containing 1 mL of concentrated nitric acid and 2.5 mL of thiourea solution (3%, w/v). The standard curve was prepared using 750, 500, 400, 250, 200, 150 and 100 mg/L solutions of pilocarpine nitrate in HCl, 0.1N ($y=0.0013x-0.2750$; $R^2=0.9957$). Alkaloid contents were expressed as pilocarpine nitrate equivalents (mg PNE / g of dry mass) [12]. These tests were performed in duplicate.

Evaluation of antioxidant activity

DPPH scavenging assay: The antioxidant activity of the extracts and standards was determined by the radical scavenging activity method using the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical [31]. Briefly, 0.1 mL aliquots of methanolic solutions of the extracts or standards at different concentrations were added to 3.9 mL of a DPPH methanolic solution. Three DPPH solutions were tested, 0.2000, 0.1242 and 0.0800 mM that were prepared by dissolving 39.4, 24.5 and 15.8 mg in 500 mL of methanol, respectively. These concentrations were selected due to the linearity range of DPPH solutions: above 0.2 mM the concentration is very high, and below 0.5 mM the color is very weak having a limited range of absorbance reading. The control sample consisted of a solution of 0.1 mL of methanol mixed with 3.9 mL of DPPH. After a 90 mins incubation period at room temperature in the dark, the absorbance was measured at 517 nm. The radical scavenging activity was calculated as follows: $I\% = [(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100$, where Abs_0 was the absorbance of the control and Abs_1 was the absorbance in the presence of the test sample at different concentrations. The IC₅₀ was calculated graphically using a calibration curve in the linear range by plotting the extract concentration vs. the corresponding scavenging effect. The antioxidant activity was expressed as the antioxidant activity index (AAI), calculated as follows: $AAI = (\text{final concentration of DPPH in the control sample} - \mu\text{g.mL}^{-1}) / (\text{IC}_{50} - \mu\text{g.mL}^{-1})$ [31]. Thus, the AAI was calculated considering the mass of DPPH and the mass of the tested sample in the reaction, resulting in a constant for each sample, independent of the concentration of DPPH and sample used. In this work, it was considered that shrub

Table 4: Phenolic content of extracts determined by RP-HPLC.

Species	Plant part	Standard Phenolic Compounds (mg/g dry matter)*								
		Gallic Acid	Vanillic Acid	Caffeic Acid	Chlorogenic Acid	Syringic Acid	p-Coumaric Acid	Ferulic Acid	Ellagic Acid	Quercetin
<i>Echinopartum ibericum</i>	Stems and Leaves	1.9 ± 0.07	N/D	N/D	8.1 ± 1.6	15.9 ± 0.2	5.4 ± 0.2	23.8 ± 3.2	6.2 ± 1.8	25.3 ± 0.1
	Flowers	N/D	5.0 ± 1.0	3.8 ± 0.6	8.5 ± 0.4	16.3 ± 3.1	5.8 ± 0.4	13.5 ± 3.9	40.1 ± 2.6	2.2 ± 0.7
<i>Pterospartum tridentatum</i>	Stems and Leaves	N/D	32.2 ± 2.6	18.2 ± 3.0	17.8 ± 0.6	8.3 ± 0.8	16.8 ± 3.2	7.4 ± 0.8	9.7 ± 1.8	6.6 ± 0.3
	Flowers	N/D	4.2 ± 0.9	3.1 ± 0.3	N/D	1.9 ± 0.4	N/D	22.2 ± 0.6	10.4 ± 0.4	9.3 ± 0.7
<i>Juniperus communis</i>	Stems	N/D	N/D	N/D	2.2 ± 0.8	N/D	2.1 ± 0.4	2.0 ± 0.7	2.9 ± 0.2	6.7 ± 0.1
	Leaves	N/D	N/D	1.1 ± 0.0	N/D	N/D	2.8 ± 0.6	3.7 ± 0.3	12.7 ± 0.3	9.8 ± 0.7
<i>Ruscus aculeatus</i>	Stems and Leaves	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	3.0 ± 0.08	N/D	N/D	4.1 ± 0.4
	Stems	1.8 ± 0.3	2.5 ± 0.1	N/D	8.2 ± 0.9	3.6 ± 0.2	3.5 ± 0.1	13.1 ± 0.8	1.3 ± 0.08	N/D
<i>Rubus ulmifolius</i>	Leaves	7.0 ± 0.4	1.1 ± 0.02	2.1 ± 0.2	4.2 ± 0.8	3.6 ± 0.5	4.1 ± 0.9	18.5 ± 0.6	4.9 ± 0.5	8.2 ± 0.5
	Flowers	3.3 ± 0.3	3.3 ± 0.5	4.6 ± 0.2	6.7 ± 0.3	4.7 ± 0.2	7.6 ± 0.5	7.0 ± 0.2	15.6 ± 0.9	33.3 ± 2.2
<i>Hakea sericea</i>	Fruits	N/D	1.4 ± 0.2	0.8 ± 0.09	6.1 ± 0.2	0.9 ± 0.3	1.2 ± 0.08	3.6 ± 0.2	0.7 ± 0.09	1.3 ± 0.1
	Stems	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	2.1 ± 0.6	11.3 ± 1.1	3.5 ± 0.6	N/D
<i>Cytisus multiflorus</i>	Leaves	N/D	1.2 ± 0.08	1.2 ± 0.1	1.9 ± 0.2	2.8 ± 0.4	3.8 ± 0.4	21.5 ± 0.9	2.6 ± 0.06	6.0 ± 0.5
	Fruits	1.2 ± 0.2	0.7 ± 0.07	1.1 ± 0.2	N/D	0.7 ± 0.01	1.7 ± 0.07	1.9 ± 0.2	3.7 ± 0.6	1.6 ± 0.03
<i>Crataegus monogyna</i>	Stems	N/D	1.2 ± 0.6	1.0 ± 0.2	3.4 ± 0.1	2.7 ± 0.2	6.9 ± 0.8	1.8 ± 0.2	9.2 ± 0.3	37.1 ± 2.6
	Leaves	1.6 ± 0.02	2.3 ± 0.6	2.0 ± 0.1	3.2 ± 0.02	1.0 ± 0.08	3.8 ± 0.8	5.7 ± 0.8	16.1 ± 2.0	7.9 ± 1.9
<i>Erica arborea</i>	Flowers	N/D	N/D	N/D	N/D	0.7 ± 0.04	1.3 ± 0.3	13.0 ± 1.6	5.4 ± 0.4	3.5 ± 0.5
	Fruits	N/D	4.3 ± 0.6	2.0 ± 0.2	2.2 ± 0.4	2.9 ± 0.2	4.2 ± 0.3	25.4 ± 4.2	16.0 ± 1.0	3.0 ± 0.08
<i>Erica arborea</i>	Stems	N/D	8.2 ± 0.5	7.7 ± 1.0	20.5 ± 1.4	4.4 ± 0.6	5.1 ± 0.7	17.2 ± 1.5	9.4 ± 1.0	N/D
	Leaves	N/D	18.9 ± 2.4	4.9 ± 0.9	10.3 ± 1.2	2.0 ± 0.3	5.3 ± 0.6	11.0 ± 1.6	7.4 ± 1.1	1.7 ± 0.2
<i>Erica arborea</i>	Flowers	0.6 ± 0.1	9.7 ± 1.5	4.4 ± 0.3	1.5 ± 0.3	1.8 ± 0.2	1.3 ± 0.06	116.8 ± 8.4	8.4 ± 1.2	9.8 ± 0.5
	Fruits	N/D	0.5 ± 0.05	N/D	3.0 ± 0.3	N/D	0.6 ± 0.1	3.3 ± 0.4	1.2 ± 0.1	0.6 ± 0.03
<i>Erica arborea</i>	Stems	N/D	1.3 ± 0.05	3.6 ± 0.6	0.8 ± 0.1	4.4 ± 0.4	3.1 ± 0.2	7.7 ± 0.9	5.1 ± 0.8	1.2 ± 0.3
	Leaves	N/D	15.1 ± 0.7	3.9 ± 0.3	17.5 ± 1.8	16.3 ± 1.0	7.5 ± 0.6	25.6 ± 1.5	9.3 ± 1.9	N/D
<i>Ipomoea acuminata</i>	Flowers	N/D	6.4 ± 0.1	2.3 ± 0.05	1.7 ± 0.3	2.5 ± 0.4	3.5 ± 0.3	6.0 ± 0.3	23.4 ± 0.9	N/D
	Stems	N/D	2.2 ± 0.1	N/D	N/D	N/D	N/D	2.4 ± 0.2	N/D	N/D
<i>Ipomoea acuminata</i>	Leaves	N/D	1.4 ± 0.2	N/D	N/D	N/D	1.0 ± 0.1	1.0 ± 0.1	N/D	9.8 ± 0.4
	Flowers	N/D	4.8 ± 0.2	N/D	N/D	N/D	2.6 ± 0.4	12.8 ± 1.7	20.5 ± 2.3	N/D

* Results in terms of mean ± standard deviation; N/D – Not detected

Table 5: GPS coordinates and altitude at which the different shrubs were collected and number of the vouchers specimens.

Full Scientific Name	GPS coordinates	Altitude (m)	Number of Voucher Specimen
<i>Echinopartum ibericum</i> Rivas Mart., Sánchez-Mata & Sancho	N 40°19.046' W 07°34.365'	1606	LISI 8/2011
<i>Pterospartum tridentatum</i> (L.) Willk subsp. <i>cantabricum</i> Spach	N 40°18.825' W 07°35.630'	1541	LISI 9/2011
<i>Juniperus communis</i> L. subsp. <i>alpina</i> (Suter) Celak.	N 40°19.046' W 07°34.365'	1606	LISI 10/2011
<i>Ruscus aculeatus</i> L.	N 40°19.105' W 07°26.791'	567	LISI 11/2011
<i>Rubus ulmifolius</i> Schott	N 40°19.167' W 07°27.247'	519	LISI 12/2011
<i>Hakea sericea</i> Schrader	N 40°20.296' W 07°27.491'	730	LISI 13/2011
<i>Cytisus multiflorus</i> (L'Hér) Sweet	N 40°18.668' W 07°27.076'	504	LISI 14/2011
<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	N 40°18.668' W 07°27.076'	504	LISI 15/2011
<i>Erica arborea</i> L.	N 40°19.046' W 07°34.365'	1606	LISI 16/2011
<i>Ipomoea acuminata</i> (Vahl) Roemer & Schultes	N 40°16.719' W 07°30.744'	649	LISI 18/2011

extracts showed poor antioxidant activity when AAI < 0.5, moderate antioxidant activity between 0.5 and 1.0, strong antioxidant activity between 1.0 and 2.0, and very strong when AAI > 2.0 [31]. Assays were carried out in duplicate and all DPPH solutions were prepared daily.

β-Carotene bleaching test: After preparation of β-carotene solution (20 mg/mL in chloroform), 20 µL was added to 40 µL of linoleic acid, 400 mg of Tween 40 and 1 mL of chloroform. This mixture was then evaporated at 45°C for

5 mins in a rotary vacuum evaporator to remove chloroform and immediately diluted with 100 mL of oxygenated distilled water. The water was added slowly to the mixture and vigorously agitated to form an emulsion. Five mL of the emulsion was transferred into test tubes containing 300 µL of extracts in methanol at different concentrations. About 5 mL of the emulsion and 300 µL of samples in methanol were used as control. Standard butylated hydroxytoluene (BHT) in methanol, at the same concentration as samples, was used as reference. The tubes were then gently shaken and placed at 50°C in a water bath for 2 h. The absorbances of the extracts, standard and control were measured at 470 nm, using a spectrophotometer, against a blank consisting of an emulsion without β-carotene. The measurements were carried out at initial time (t=0 h) and at final time (t=2 h). The antioxidant activity was measured in terms of percentage of inhibition of β-carotene's oxidation by:

$$\% \text{ Inhibition} = \frac{(\text{Abs}^{t=2}_{\text{sample}} - \text{Abs}^{t=2}_{\text{control}})}{(\text{Abs}^{t=0}_{\text{control}} - \text{Abs}^{t=2}_{\text{control}})}$$
 Where $\text{Abs}^{t=2}$ was the absorbance of the sample or control at final time of incubation and $\text{Abs}^{t=0}$ was the absorbance in the control at initial time of incubation [19].

RP-HPLC analysis of phenolics: Chromatographic analysis was performed with the use of a liquid chromatographic system, which consisted of a Perkin Elmer Binary LC Pump 250, Perkin Elmer UV-visible Spectrophotometric Detector LC 290 and Perkin Elmer LC Oven 101 with a loop of 50 µL. The chromatographic system was connected through the Data Apex U-PAD2

USB Acquisition Device to a PC computer. Software used for data acquisition and evaluation was Clarity Lite Data Apex. The separation was carried out on a 150×4.60 mm, Phenomenex Kinetex Luna 2.6µ PFP 100A reversed phase column equipped with a Phenomenex KrudKatcher Ultra HPLC In-Line Filter with 0.5 µm porosity. Standard solutions were filtered through a 0.22 µm pore membrane filter before injection and crude methanolic extracts were centrifuged and then filtered through a 0.22 µm pore membrane filter before injection. The injection volume for all samples was 50 µL. The mobile phase consisted of 2 solvents: Solvent A, water with acetic acid (pH=3) and Solvent B, acetonitrile/solvent A (6:4; v/v). The mobile phase was filtered through a 0.22 µm pore membrane filter and degasified with nitrogen. Phenolic compounds were eluted under the following conditions: 1 mL/min flow rate and the column temperature was set at 35°C, isocratic conditions from 0 to 10 mins with 0% B, linear gradient conditions from 0% to 5% B in 30 mins, from 5% to 15% B in 18 mins, from 15% to 25% B in 14 mins, from 25% to 50% B in 31 mins, from 50% to 100% B in 3 mins, followed by washing and reconditioning the column. For detection, chromatograms were monitored by ultra-violet-visible spectra (280 nm), which were recorded for all

peaks. Duplicate analyses were performed for each sample. The identification of phenolic compounds was obtained by using authentic standards, while quantification was performed using the external standard method. Stock solutions of standard compounds at a concentration of 1 mg/mL each were prepared in methanol, and several dilutions with methanol were made. The solutions of standards at various concentrations (1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.15 mg/mL) were injected into the HPLC system and the calibration curves were established for each standard compound. The concentration of the compound was calculated from peak area according to calibration curves. The amount of each phenolic compound was expressed as mg/g of dry mass [35,41,42].

Acknowledgments - Ângelo Luís acknowledges a fellowship from *Fundação Para a Ciência e a Tecnologia* (Reference: SFRH / BD / 65238 / 2009). Authors wish to thank Prof. Dr Dalila Espirito Santo and Dr Paula Paes, from the Herbarium of the *Instituto Superior de Agronomia (Jardim Botânico d'Ajuda, Lisboa)*, for the identification and deposit of the vouchers specimens of the plant species used in this work.

References

- [1] Aparicio A, Guisande R. (1997) Replenishment of the endangered *Echinopartum albigicum* (Genistea, Fabaceae) from the soil seed bank. *Biological Conservation*, **81**, 267-273.
- [2] Vitor R, Mota-Filipe H, Teixeira G, Borges C, Rodrigues A, Teixeira A, Paulo A. (2004) Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury. *Journal of Ethnopharmacology*, **93**, 363-370.
- [3] Gordien A, Gray A, Franzblau S, Seidel V. (2009) Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L. (Cupressaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, **126**, 500-505.
- [4] Mimaki Y, Kuroda M, Yokosuka A, Sashida Y. (1999) A spirostanol saponin from the underground parts of *Ruscus aculeatus*. *Phytochemistry*, **51**, 689-692.
- [5] Sisti M, Santi M, Fraternali D, Ninfali P, Scoccianti V, Brandi G. (2008) Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized in *in vitro* culture. *LWT-Food Science and Technology*, **41**, 946-950.
- [6] Le Maitre D, Krug R, Hoffmann J, Gordon A, Mgeidi T. (2008) *Hakea sericea*: Development of a model of the impacts of biological control on population dynamics and rates of spread of an invasive species. *Ecological Modelling*, **212**, 342-358.
- [7] Raja S, Ahamed K, Kumar V, Mukherjee K, Bandyopadhyay A, Murkherjee P. (2007) Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against tetrachloride treated liver injury in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, **109**, 41-47.
- [8] García M, Sáenz M, Ahumada M, Cert A. (1997) Isolation of three triterpenes and several aliphatic alcohols from *Crataegus monogyna* Jacq. *Journal of Chromatography A*, **767**, 340-342.
- [9] Harfani H, Bouanani N, Aziz M, Caid H, Ghalim N, Amrani S. (2007) The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers extract in Triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: A comparison with fenofibrate. *Journal of Ethnopharmacology*, **109**, 156-160.
- [10] Terahara N, Konczak I, Ono H, Yoshimoto M, Yamakawa O. (2004) Characterization of acylated anthocyanins in callus induced from storage root of purple-fleshed sweet potato, *Ipomoea batatas* L. *Journal of Biomedical Biotechnology*, **5**, 279-286.
- [11] Xu W, Zhang F, Luo Y, Ma L, Kou X, Huang K. (2009) Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum*. *Carbohydrate Research*, **344**, 217-222.
- [12] Sreevidya N, Mehotra S. (2003) Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff's reagent in plant materials. *Journal of AOAC International*, **86**, 1124-1127.
- [13] Silva E, Souza J, Rogez H, Rees J, Larondelle Y. (2007) Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian regions. *Food Chemistry*, **101**, 1012-1018.
- [14] Surveswaran S, Cai, Y, Corke H, Sun M. (2007) Systematic evaluation of natural phenolic antioxidant from 133 Indian medicinal plants. *Food Chemistry*, **102**, 938-953.
- [15] Cicco N, Lanorte M, Paraggio M, Viggiano M. (2009) A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, **91**, 107-110.
- [16] Bahorum T, Aumjaud E, Ramphul H, Rycha M, Luximon-Ramma A, Trotin F, Anuoma O. (2003) Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (hawthorn) callus extracts. *Nahrung/Food*, **43**, 191-198.
- [17] Barros L, Carvalho A, Ferreira C. (2010) Comparing the composition and bioactivity of *Crataegus monogyna* flowers and fruits used in folk medicine. *Phytochemical Analysis DOI:10.1002/pca.1267*.

- [18] Konczak-Islam I, Yoshimoto M, Hou D, Terahara N, Yamakawa O. (2003) Potential chemopreventive properties of anthocyanin-rich aqueous extracts from *in vitro* tissue of sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **51**, 5916-5922.
- [19] Luis A, Domingues F, Gil C, Duarte AP. (2009) Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica* spp. *Journal of Medicinal Plants Research*, **3**, 886-893.
- [20] Dall'Acqua S, Cervellati R, Loi M, Innocenti G. (2008) Evaluation of *in vitro* antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: Investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*. *Food Chemistry*, **106**, 745-749.
- [21] Öztürk M, Tümen İ, Uğür A, Aydoğmuş-Öztürk F, Topçu G. (2011) Evaluation of fruit extracts of six Turkish *Juniperus* species for their antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activities. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **91**, 867-876.
- [22] Arouma O. (2003) Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. *Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, **523-524**, 9-20.
- [23] Alim A, Goze I, Goze H, Tepe B. (2009) *In vitro* antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts of *Salvia cedronella* Boiss. *Journal of Medicinal Plants Research*, **3**, 413-419.
- [24] Andrade D, Gil C, Breitenfeld L, Domingues F, Duarte A. (2009) Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* L. and *Arbutus unedo* L. *Industrial Crops and Products*, **30**, 165-167.
- [25] Orhan N, Orhan I, Ergun F. (2011) Insights into cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of five *Juniperus* species. *Food and Chemical Toxicology* DOI:10.1016/j.fct.2011.06.031.
- [26] Prakash A, Pereira T, Reilly P, Seawright A. (1999) Pyrrolizidine alkaloids in human diet. *Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, **443**, 53-67.
- [27] Çam M, Hişil Y, Durmaz G. (2009) Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods. *Food Chemistry*, **112**, 721 – 726.
- [28] Krishnaiah D, Sarbatly R, Nithyanandam R. (2010) A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food Bioprocess Processing*, DOI:10.1016/j.fbp.2010.04.008.
- [29] Tadić V, Dobrić S, Marković G, Đorđević S, Arsić I, Menković N, Stević T. (2008) Anti-inflammatory, gastroprotective, free-radical-scavenging, and antimicrobial activities of hawthorn berries ethanol extract. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **56**, 7700-7709.
- [30] Faustino H, Gil N, Baptista C, Duarte A. (2010) Antioxidant activity of lignin phenolic compounds extracted from kraft and sulphite black liquors. *Molecules* DOI:10.3390/molecules15129308.
- [31] Sherer R, Godoy H. (2009) Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry*, **112**, 654-658.
- [32] Wang B, Zhang W, Duan X, Li X. (2009) *In vitro* antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (Rhodomelaceae). *Food Chemistry*, **113**, 1101-1105.
- [33] Fu L, Xu B, Xu X, Qin X, Gan R, Li H. (2010) Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China. *Molecules*. DOI:10.3390/molecules15128602.
- [34] Miliuskas G, Venskutonis P, van Beek T. (2004) Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry*, **85**, 231-237.
- [35] Kelebek H, Selli S, Canbas A, Cabaroğlu T. (2009) HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. *Microchemical Journal*, **91**, 187-192.
- [36] Pourmorad F, Hosseinimehr S, Shahabimajid N. (2006) Antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology*, **5**, 1142-1145.
- [37] Tawaha K, Alali F, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elimat T. (2007) Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian species. *Food Chemistry*, **104**, 1372-1378.
- [38] Vitti D, Abdalla A, Bueno I, Filho J, Costa C, Bueno M, Nozella E, Longo C, Vieira E, Filho S, Godoy P, Mueller-Harvey I. (2005) Do all tannins have similar nutritional effects? A comparison of three Brazilian fodder legumes. *Animal Feed Science and Technology*, **119**, 345-361.
- [39] Wannas W, Mhamdi B, Sriti J, Jemia M, Ouchick O, Hamdaoui G, Kchouk M, Marzouk B. (2010) Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. *Food and Chemical Toxicology*, **48**, 1362-1370.
- [40] Rubanza C, Shen M, Otsyina R, Bakengesa S, Ichinohe T, Fujihara T. (2005) Polyphenolics and tannins effect on *in vitro* digestibility of selected *Acacia* species leaves. *Animal Feed Science and Technology*, **119**, 129-142.
- [41] Fernández-Arroyo S, Barrajón-Catalán E, Micol V, Segura-Carretero A, Fernández-Gutiérrez A. (2010) High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a *Cistus ladanifer* aqueous extract. *Phytochemical Analysis*, **21**, 307-313.
- [42] Tarnawski M, Depta K, Grejcium D, Szelepin B. (2006) HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract - a natural immunomodulator. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, **41**, 182-188.

2.2. *Ailanthus altissima*: uma fonte de compostos bioativos com atividade antioxidante

Artigo 2

***Ailanthus altissima* (Miller) Swingle: A Source of Bioactive Compounds with Antioxidant Activity**

Ângelo Luís, Nuno Gil, Maria Emília Amaral, Fernanda Domingues, Ana Paula Duarte

BioResources, 7 (2), 2105 - 2120, 2012

AILANTHUS ALTISSIMA (MILLER) SWINGLE: A SOURCE OF BIOACTIVE COMPOUNDS WITH ANTIOXIDANT ACTIVITY

Ângelo Luís,^a Nuno Gil,^b Maria Emília Amaral,^b Fernanda Domingues,^a and Ana Paula Duarte^{a,*}

Ailanthus altissima (Miller) Swingle is a tree used in Chinese traditional medicine as a bitter aromatic drug and in the treatment of colds and gastric diseases. Previous phytochemical studies have demonstrated the presence of quassinoids in the plant, as well as indole alkaloids. The purpose of this work was to determine the phenolic, flavonoid, and total alkaloid contents of the ethanolic, methanolic, acetone, and hydroalcoholic crude extracts of *A. altissima* and then try to correlate them with antioxidant activity of corresponding extracts. Moreover, the phenolic compounds present in the extracts were analyzed by RP-HPLC. Extracts from leaves have greater phenolic content than the other parts of this tree. Concerning the extraction process, it is possible to conclude that the mixture of water and ethanol is the best solvent to extract substances with antioxidant activity. Analysis by RP-HPLC showed that ferulic acid was the most dominant hydroxycinnamic acid, with an occurrence percentage of 25.59%. These results presented a positive linear correlation between antioxidant activity index and total phenolic content of all the extracts.

Keywords: *Ailanthus altissima*; Phenolic compounds; Flavonoids; Antioxidant activity; RP-HPLC

Contact information: a: CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal; b: Research Unit of Textile and Paper Materials, University of Beira Interior, Rua Marquês d'Ávila e Bolama, 6201-001 Covilhã, Portugal;

*Corresponding author: apcd@ubi.pt

INTRODUCTION

Invasive exotic species have significant negative impacts on socio-ecological systems. Some invasive species cause acute socio-ecological problems; other impacts are subtler, and are the cause of longer-term change, such as changes to the composition and function of ecosystems and the loss of biodiversity. *Ailanthus altissima* (Miller) Swingle is an example of a vegetal species that is invasive and exotic in various countries (Bardsley and Edwards-Jones 2007), including in Portugal. *A. altissima*, the tree-of-heaven, is native in China and was introduced in Europe around the end of 18th century. Although they are scentless on the tree, the leaves and flowers have an unpleasant odor when crushed. *A. altissima* is used in Chinese traditional medicine as a bitter aromatic drug in the treatment of colds and gastric diseases. Previous phytochemical studies have demonstrated the presence of quassinoids in the plant, as well as indole alkaloids. Lipids and fatty acids, phenolic derivatives, and volatile compounds from leaves have also been characterized. Extracts with organic solvents of tree-of-heaven and some isolated compounds have demonstrated medicinal properties (Feo et al. 2003).

The ways in which plants interact with other organisms in an environment are complex. The production and/or the accumulation of secondary metabolites could have different functions: self-defense, sexual attraction, symbiosis, and development (Feo et al. 2003). There is an increasing interest in the measurement and use of plant antioxidants for scientific research, as well as industrial purposes (dietary, pharmaceutical, and cosmetic). This is mainly due to their strong biological activity, exceeding those of many synthetic antioxidants that have possible activity as promoters of carcinogenesis. Therefore, the need exists for safe, economic, powerful, and natural antioxidants to replace these synthetic ones. In addition, antioxidants are an important group of medicinal preventive compounds, as well as being food additives inhibiting detrimental changes of easily oxidizable nutrients (Ksouri et al. 2009). Amongst the antioxidants, several groups of polyphenols are currently used in the industry as nutraceuticals and/or functional foods. Some antioxidant compounds are extracted from easily available sources, such as agricultural and horticultural crops, or medicinal plants.

Phenolic compounds play an important role for normal growth in plant development, as well as defense against infection and injury. The presence of phenolics in injured plants may have an important effect on oxidative stability and microbial safety (Ksouri et al. 2009). On the other hand, the number of contributions on isolation and activity-testing of plant antioxidants has significantly increased in recent years. Several studies have described the antioxidant properties of medicinal plants, foods, and beverages that are rich in phenolic compounds because of their high redox potentials. Such compounds act as reducing agents, hydrogen donors, singlet oxygen quenchers, free radical scavengers, and as chelating agents of pro-oxidant metals, such as transition metals. It was recently showed that phenolic antioxidants in herbs have capacities of quenching lipid per-oxidant, preventing DNA oxidative damage, and scavenging reactive oxygen species (Ksouri et al. 2009).

Although the potential benefits of antioxidants such as phenolic compounds, against reactive oxygen species (ROS), it is well known that ROS are not only harmful agents that cause oxidative damage in pathologies, they also have important roles as regulatory agents in a range of biological phenomena (Murphy et al. 2011).

The purpose of this work was to determine the phenolic, flavonoid, and total alkaloid contents of the ethanolic, methanolic, acetone, and hydroalcoholic crude extracts of *A. altissima* and then try to correlate them with antioxidant activity of the same extracts. Then, the phenolic compounds present in the extracts were analyzed by reversed-phase-HPLC (RP-HPLC). The Folin-Ciocalteu's method was used for the determination of total phenols, a colorimetric method with aluminum chloride was used in the determination of total flavonoids, and Dragendorff's reagent method was used for alkaloids estimation. The methods of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) and β -carotene bleaching test were used to assess the antioxidant activity of extracts.

EXPERIMENTAL

Plant Material

Aerial parts (stems, stalks, and leaves) of *A. altissima* were collected in *Serra da Estrela* (GPS coordinates: N 40° 16,719'; W 07° 30,744'; altitude: 649 m). Plant

materials were dried at 35 °C in a ventilated oven during 48 hours and reduced to coarse powder (< 2 mm) using a laboratory cutting mill. Harvesting and transport of this plant were authorized by *Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade*. The vegetal specie was identified (*Ailanthus altissima* (Miller) Swingle) by a botanist, and a voucher specimen has been deposited in the Herbarium (LISI 19/2011) of the *Instituto Superior de Agronomia (Jardim Botânico d'Ajuda, Lisboa)*.

Extraction Process

Ethanolic, methanolic, and acetone extracts were carried out with a Soxhlet apparatus, using 100 g of raw material and 1000 mL of solvent. Hydroalcoholic extractions, water/ethanol (50:50; v/v), were performed by refluxing, using 100 g of plant samples with 1000 mL of solvent. The extract solutions were filtered under vacuum using a crucible of porosity #2 and then evaporated under vacuum to remove the solvents to a final volume of 150 mL. Then, 5 mL of each extract was diluted in 45 mL of methanol. Aliquots (5 mL) of the extracts were removed for subsequent evaporation to dryness for the calculation of extraction yield and extracts concentration.

Total Phenolic Compounds Determination

The phenolics were determined by Folin-Ciocalteu's colorimetric method. The methanolic solutions of each extract (50 µL) or gallic acid (standard phenolic compound) were mixed with 450 µL of distilled water, and then 2.5 mL of 0.2 N Folin-Ciocalteu's reagent (diluted with distilled water) was added. The mixtures were allowed to stand for 5 minutes, and then 2 mL of aqueous Na₂CO₃ (75 g/L) was added. After incubation of these reaction mixtures (90 minutes / 30 °C), the total phenols were determined by colorimetry at 765 nm. The standard curve was prepared using 500, 400, 350, 325, 300, 250, 225, 200, 150, 125, 100, and 50 mg/L solutions of gallic acid in methanol ($y=0.0009x$; $R^2=0.9875$). Total phenolic values were expressed as gallic acid equivalents (mg GAE / g of dry mass), which is a common reference compound for phenolic compounds (Tawaha et al. 2007; Pourmorad et al. 2006). The tests were conducted in triplicate.

Flavonoids Determination

Aluminum chloride colorimetric method was used for flavonoids determination according to Pourmorad et al. (2006). Each extract (500 µL) in methanol was separately mixed with 1.5 mL of methanol, 0.1 mL of 10 % aluminum chloride, 0.1 mL of 1 M potassium acetate, and 2.8 mL of distilled water. This solution remained at room temperature for 30 minutes; the absorbance of the reaction mixture was measured at 415 nm using a spectrophotometer.

The calibration curve was constructed by preparing eight quercetin solutions at concentrations ranging from 12.5 to 200 µg/mL in methanol ($y=0.0074x$; $R^2=0.9980$). Total flavonoid values were expressed as quercetin equivalents (mg QE / g of dry mass), which is a common reference compound for flavonoids (Pourmorad et al. 2006). These determinations were made in duplicate.

Alkaloids Estimation

The alkaloids estimation was performed by the spectrophotometric method of Dragendorff's reagent, as described by Sreevidya and Mehotra (2003). Briefly, 10 mL of each crude extract was centrifuged for 10 minutes (3000 rpm) to remove residual suspended particles, and then 5 mL of the supernatant was mixed with 1 mL of 0.1 N HCl. Then, 2.5 mL of Dragendorff's reagent was added to the previous mixture for precipitation, and the precipitate was centrifuged for 5 minutes (3000 rpm). This precipitate was further washed with 2.5 mL of ethanol. The filtrate was discarded, and the residue was then treated with 2.5 mL of disodium sulfide solution (1 % w/v). The brownish black precipitate formed was then centrifuged (5 minutes, 3000 rpm). This residue was dissolved in 2 mL of concentrated nitric acid, with warming if necessary; this solution was diluted to 10 mL in a standard flask with distilled water, and 1 mL was then pipetted out and mixed with 5 mL of thiourea solution (3 % w/v). The absorbance of this solution was measured at 435 nm against a blank containing 1 mL of concentrated nitric acid and 2.5 mL of thiourea solution (3 % w/v). The standard curve was prepared using 750, 500, 400, 250, 200, 150, and 100 mg/L solutions of pilocarpine nitrate in 0.1N HCl ($y=0.0013x-0.2750$; $R^2=0.9957$). Alkaloid contents were expressed as pilocarpine nitrate equivalents (mg PNE / g of dry mass) (Sreevidya and Mehotra 2003). These tests were performed in duplicate.

Evaluation of Antioxidant Activity

DPPH scavenging assay

The antioxidant activity of the extracts and standards (gallic acid, quercetin, rutin, and trolox) was determined by the radical scavenging activity method using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical as described by Scherer and Godoy (2009). Briefly, 0.1 mL aliquots of methanolic solutions of the extracts or standards at different concentrations were added to 3.9 mL of a DPPH methanolic solution. Three DPPH solutions were tested: 0.2000, 0.1242, and 0.0800 mM prepared by dissolving 39.4, 24.5, and 15.8 mg in 500 mL of methanol, respectively. These concentrations were selected due to the linearity range of DPPH solutions: above 0.2 mM the concentration is very high, and below 0.5 mM the color is very weak, having a limited range of absorbance reading. The control sample consisted in a solution of 0.1 mL of methanol mixed with 3.9 mL of DPPH. After a 90 min incubation period at room temperature in the dark, the absorbance was measured at 517 nm. The radical scavenging activity was calculated as follows,

$$I\% = [(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100 \quad (1)$$

where Abs_0 was the absorbance of the control, and Abs_1 was the absorbance in the presence of the test sample at different concentrations. The IC_{50} (concentration providing 50% inhibition of DPPH radicals) was calculated graphically using a calibration curve in the linear range by plotting the extract concentration vs. the corresponding scavenging effect.

The antioxidant activity was expressed as the antioxidant activity index (AAI), calculated as follows (Scherer and Godoy 2009):

$$AAI = (\text{final concentration of DPPH in the control sample} - \mu\text{g.mL}^{-1}) / (\text{IC}_{50} - \mu\text{g.mL}^{-1}) \quad (2)$$

Thus, the AAI was calculated considering the mass of DPPH and the mass of the tested sample in the reaction, resulting in a constant for each sample, independent of the concentration of DPPH and the sample used. In this work, it was observed that shrub extracts showed poor antioxidant activity when $AAI < 0.5$, moderate antioxidant activity when AAI was between 0.5 and 1.0, strong antioxidant activity when AAI between 1.0 and 2.0, and very strong antioxidant activity when $AAI > 2.0$, according to Scherer and Godoy (2009). Assays were carried out in duplicate, and all the samples and standard solutions, as well as the DPPH solutions, were prepared daily (Scherer and Godoy 2009).

β-carotene bleaching test

The β-carotene bleaching test was also used to evaluate the antioxidant activity of the extracts. Twenty μL of β-carotene solution (20 mg/mL in chloroform) was added to 40 μL of linoleic acid, 400 mg of Tween 40, and 1 mL of chloroform. This mixture was then evaporated at 45 °C for 5 minutes by using a rotary vacuum evaporator to remove chloroform and immediately diluted with 100 mL of oxygenated distilled water. The water was added slowly to the mixture and vigorously agitated to form an emulsion. 5 mL of the emulsion were transferred into test tubes containing 300 μL of extracts in methanol at different concentrations. 5 mL of the emulsion and 300 μL of samples in methanol were used as control. Standard butylated hydroxytoluene (BHT) in methanol, at the same concentration as the samples, was used as reference. The tubes were then gently shaken and placed at 50 °C in a water bath for 2 hours. The absorbances of the standard and control extracts were measured at 470 nm, using a spectrophotometer, against a blank consisting of an emulsion without β-carotene. The measurements were carried out at initial time ($t=0$ h) and at final time ($t=2$ h). All samples were assayed in duplicate. The antioxidant activity was measured in terms of percentage of inhibition of β-carotene's oxidation by,

$$\% \text{ Inhibition} = (\text{Abs}_{t=2\text{sample}} - \text{Abs}_{t=2\text{control}}) / (\text{Abs}_{t=0} - \text{Abs}_{t=2\text{control}}) \quad (3)$$

where $\text{Abs}_{t=2}$ was the absorbance of the sample or control at the final time of incubation and $\text{Abs}_{t=0}$ was the absorbance in the control at the initial time of incubation (Luís et al. 2009).

RP-HPLC Analysis of Phenolics

A simple and quick RP-HPLC method for determination of phenolic compounds was developed. Chromatographic analysis was performed with the use of liquid chromatographic system, which consisted of Perkin Elmer Binary LC Pump 250, Perkin Elmer UV-visible Spectrophotometric Detector LC 290, and Perkin Elmer LC Oven 101 with loop of 50 μL. The chromatographic system was connected through the Data Apex U-PAD2 USB Acquisition Device to the PC computer. Software used for data acquisition and evaluation was Clarity Lite Data Apex. The separation was carried out on a 150×4.60 mm, Phenomenex Kinetex Luna 2.6 μm PFP 100A reversed phase column equipped with

Phenomenex KrudKatcher Ultra HPLC In-Line Filter with 0.5 μm porosity. Standard solutions were filtered through a 0.22 μm pore size membrane filter before injection, and crude methanolic extracts were centrifuged and then filtered through a 0.22 μm pore size membrane filter before injection. The injection volume for all samples was 50 μL . The mobile phase consisted of two solvents: Solvent A, water with acetic acid (pH=3) and Solvent B, acetonitrile/solvent A (60:40; v/v). The mobile phase was filtered through a 0.22 μm pore size membrane filter and degasified with nitrogen. Phenolic compounds were eluted under the following conditions: 1 mL/min flow rate, the column temperature set at 35 $^{\circ}\text{C}$, isocratic conditions from 0 to 10 min with 0 % B, linear gradient conditions from 0 % to 5 % B in 30 min, from 5 % to 15 % B in 18 min, from 15 % to 25 % B in 14 min, from 25 % to 50 % B in 31 min, from 50 % to 100 % B in 3 min, followed by washing and reconditioning the column. For detection, chromatograms were monitored by the ultra-violet-visible spectra (280 nm), and results were recorded for all peaks. Duplicate analyses were performed for each sample. The identification of phenolic compounds was obtained by using authentic standards and by comparing the retention times, while quantification was performed using the external standard method. Stock solution of standard compounds at concentration 1 mg/mL each was prepared in methanol, and several dilutions with methanol were made. Standard compounds used were: gallic acid, vanillic acid, caffeic acid, chlorogenic acid, syringic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid, ellagic acid, and quercetin. The solutions of standards at various concentrations (1.00, 0.75, 0.50, 0.25, 0.15 mg/mL) were injected into the HPLC system, and the calibration curves were established for each standard compound. The concentration of the compound was calculated from peak area according to calibration curves. The amount of each phenolic compound was expressed as milligram per gram of dry mass (mg / g of dry mass) (Kelebek et al. 2009; Fernández-Arroyo et al. 2010; Tarawski et al. 2006).

RESULTS AND DISCUSSION

From the results presented in Table 1, generally leaves gave rise to a higher extraction yield than the other parts of the plant. The extraction yields obtained in the present study were very similar to those obtained for some medicinal plants reported in literature (Silva et al. 2007).

Phenolic compounds are one of the most important groups of compounds that occur in plants. These compounds are reported to exhibit anticarcinogenic, anti-inflammatory, antiatherogenic, antithrombotic, immune-modulating, and analgesic activities, among others (Kassim et al. 2010). In this study, these compounds were determined with the colorimetric method of Folin-Ciocalteu's reagent, which is a very well established and widely used method for total phenolics quantitation. Nevertheless, this method has some limitations; namely, the Folin-Ciocalteu's reagent can react with other non-phenolic reducing compounds and can lead to the overvaluation of the phenolic compounds. These values only intend to provide a relative result for comparison between the different extracts. As can be seen in Table 2, generally, extracts from leaves yielded higher amounts of phenolic compounds than the extracts from stems and stalks.

Table 1. Extraction Yields of the Different Types of Extraction for the Several Parts of the Plant (%)

Solvent	Plant part	Extraction yield (%) *
Ethanol	Stems	6.28 ± 0.45
	Stalks	6.32 ± 0.46
	Leaves	24.70 ± 0.75
Acetone	Stems	3.59 ± 0.39
	Stalks	2.67 ± 0.33
	Leaves	24.25 ± 0.60
Hydroalcoholic (50/50 v:v)	Stems	8.42 ± 0.20
	Stalks	13.38 ± 0.16
	Leaves	29.75 ± 2.60
Methanol	Stems	8.69 ± 1.13
	Stalks	12.47 ± 0.10
	Leaves	24.96 ± 5.13

* Results in terms of mean ± standard deviation

Referring to Table 2, hydroalcoholic extracts presented the biggest concentration of total phenolics, which indicates that this mixture of solvents is the best to use in the extraction of these compounds from plants. However, this method can also quantify some derivatives of sugars that can be extracted by this mixture of solvents. Acetone is the solvent used that extracted the least concentration of phenolic compounds. The acetone extracts of stalks of *A. altissima* were the ones with the lowest quantity of phenolics, in contrast to the hydroalcoholic extract of leaves, which was the richest in phenolics.

Flavonoids, which are partly responsible for the pigmentation of flowers, fruits, and leaves, are polyphenolic compounds that occur ubiquitously in edible plants and structurally have variations in the C ring that characterizes the different types, namely flavonols, flavones, isoflavones, flavonones, flavanol, and anthocyanins (Aruoma 2003; Surveswaran et al. 2007). Flavonoids could act as antioxidants because they can readily donate an electron or a hydrogen atom to a peroxy or alkoxy radical to terminate a lipid peroxidation chain reaction or to regenerate a phenolic/flavonoid compound; or they can effectively chelate a pro-oxidant transition metal (Aruoma 2003). The process used in quantitative methods for the flavonoids determination is performed by precipitating them with aluminum chloride in an alkalized medium (Alim et al. 2009). Table 2 shows the results of the determination of flavonoids in all the extracts of *A. altissima*. It is possible to conclude that the methanolic extracts of stalks are the ones that present the lower concentration in flavonoids, or in other way, that the acetone extract of leaves is the richest extract in flavonoids. These results are very similar to those obtained previously by Andrade et al. (2009).

In the most cases no single chemical component is responsible for the medicinal properties of plant-based drugs, and their synergic action or bioenhancement is due to the

presence of other chemical substances in the plant material. Therefore, the determination of the total amount of different classes of components is essential for the standardization of the plants (Sreevidya and Mehotra 2003). Alkaloids are low molecular weight nitrogen-containing substances with characteristic toxicity and pharmacological activity (De Luca and Pierre 2000). As alkaloids have therapeutic efficacy and bioenhancing properties, the estimation of total alkaloids in plants bearing alkaloids and formulations that contain them as therapeutic agents becomes essential (Sreevidya and Mehotra 2003). All the extracts contain large amounts of alkaloids (Table 2), which is in agreement with the literature. Other studies have reported the presence of alkaloids in *A. altissima* (Feo et al. 2003). In particular, the acetone extract of stalks is the one that exhibited the highest amount of these compounds.

Table 2. Contents of Phenolics, Flavonoids, and Alkaloids of the Extracts

Solvent	Plant part	Total phenolic compounds (mg GAE / g dry matter) *	Flavonoids (mg QE / g dry matter) *	Alkaloids (mg PNE / g dry matter) *
Ethanol	Stems	44.95 ± 0.97	8.04 ± 0.05	17.91 ± 1.49
	Stalks	52.48 ± 1.69	17.30 ± 0.63	9.37 ± 1.25
	Leaves	136.55 ± 1.31	87.09 ± 0.94	14.42 ± 1.88
Acetone	Stems	48.60 ± 1.59	20.62 ± 0.22	15.37 ± 0.91
	Stalks	25.96 ± 1.35	31.51 ± 1.57	28.84 ± 0.91
	Leaves	106.96 ± 0.35	122.53 ± 0.68	6.53 ± 1.38
Hydroalcoholic (50/50 v:v)	Stems	65.61 ± 1.54	7.47 ± 0.36	15.44 ± 1.08
	Stalks	149.52 ± 2.04	22.82 ± 0.17	27.58 ± 0.20
	Leaves	158.72 ± 0.38	29.59 ± 0.25	19.19 ± 0.19
Methanol	Stems	53.49 ± 2.55	7.73 ± 1.29	14.08 ± 1.18
	Stalks	15.88 ± 0.49	3.69 ± 0.05	18.38 ± 0.57
	Leaves	151.80 ± 1.02	68.39 ± 0.13	16.68 ± 0.45

* Results in terms of mean ± standard deviation

One problem in the determination of the antioxidant activity is that this activity is variable depending on the method used. It is known that an antioxidant mechanism in various biological matrices is very complex and many other factors may intervene in this mechanism (Çam et al. 2009). Given this complexity, the use of only one method to determine the antioxidant activity of the extracts is not sufficient to reach a conclusion. In this sense, we have applied two different methods and diverse antioxidant properties can then be determined.

It is well known that the antioxidants react with the stable free radical DPPH (deep violet color) and convert it to 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H) with discoloration. The antioxidant effect of plant extracts on DPPH radical scavenging may

be due to their hydrogen donating ability, as well as the reduction of the stable violet DPPH radical to yellow DPPH-H (Ahmadi et al. 2010).

Free-radical scavenging properties of extracts of *A. altissima* are presented in Table 3. Hydroalcoholic extracts are the ones that exhibited the greatest antioxidant properties measured by the DPPH scavenging method. These results indicate that the mixture of water and ethanol is the solvent more appropriate to extract substances with antioxidant activity. This is in agreement with the results obtained for the phenolics determination, which suggests that the total phenolic compounds were responsible for the antioxidant activity of the extracts. The hydroalcoholic extract of leaves is the extract with the greatest value of AAI, which classifies the antioxidant activity of this extract as “very strong.” The methanolic extract of stalks showed a poor antioxidant activity. Generally, all the extracts of *A. altissima* presented great antioxidant activity when compared with the standards. These results are in agreement with the study of Rahman et al. (2009), who also reported a high antioxidant activity and high levels of phenolic compounds in extracts of leaves from *A. altissima*. However, in this work a more detailed characterization of the bioactive compounds and antioxidant activity of different extracts, from the aerial parts of *A. Altissima*, was done.

Table 3. Antioxidant Properties of *A. altissima* Extracts and Standards

Solvent	Plant part	IC ₅₀ (mg/L) *	AAI *	Antioxidant Activity
Ethanol	Stems	65.69 ± 2.58	0,88 ± 0,03	Moderate
	Stalks	77.49 ± 3.34	0,78 ± 0,14	Moderate
	Leaves	28.53 ± 0.34	2,01 ± 0,03	Very Strong
Acetone	Stems	58.00 ± 3.53	0,99 ± 0,06	Moderate
	Stalks	96.24 ± 3.52	0,59 ± 0,02	Moderate
	Leaves	36.29 ± 1.18	1,58 ± 0,05	Strong
Hydroalcoholic (50/50 v:v)	Stems	65.45 ± 2.12	0,87 ± 0,03	Moderate
	Stalks	26.23 ± 0.63	2,15 ± 0,06	Very Strong
	Leaves	22.98 ± 0.42	2,44 ± 0,06	Very Strong
Methanol	Stems	80.11 ± 3.29	0,67 ± 0,03	Moderate
	Stalks	162.46 ± 2.10	0,33 ± 0,01	Poor
	Leaves	20.23 ± 0.31	2,64 ± 0,05	Very Strong
Rutin		10.66 ± 0.39	4.90 ± 0.21	Very Strong
Quercetin		4.32 ± 0.39	12.17 ± 1.71	Very Strong
Trolox		8.38 ± 0.13	6.62 ± 0.10	Very Strong
Gallic Acid		2.23 ± 0.02	22.77 ± 0.25	Very Strong
* Results in terms of mean ± standard deviation				

In the β -carotene bleaching test, oxygen is needed for linoleic acid oxidation and to convert it to lipid hydroperoxide. This compound is very active and attacks the highly unsaturated β -carotene molecules, giving rise to the bleaching of its characteristic yellow color in solution. Antioxidants perform their inhibition by various mechanisms such as peroxide decomposition or chain stopping and neutralization of linoleate-free radical and other free radicals formed in the system (Ahmadi et al. 2010; Rajaei et al. 2010). All the extracts presented antioxidant properties when compared with the synthetic antioxidant BHT, as measured by this method. Based on Figures 1 to 4, it is possible to conclude that extracts from leaves of *A. altissima* are potent antioxidants, allowing high percentages of inhibition of oxidation of β -carotene molecules. These results indicate that this plant is a potential source of compounds with the ability to inhibit lipid peroxidation. Figure 1 presents the behavior of ethanolic extracts, and as mentioned above, extracts of leaves showed the greatest antioxidant activity measured by this method.

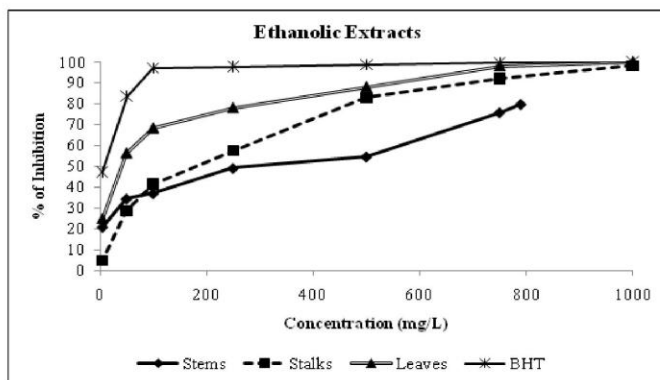


Fig. 1. Antioxidant activity of ethanolic extracts measured by β -carotene bleaching test

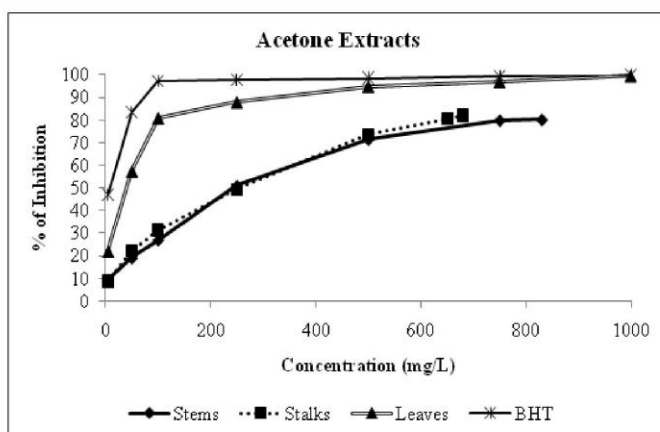


Fig. 2. Antioxidant activity of acetone extracts measured by β -carotene bleaching test

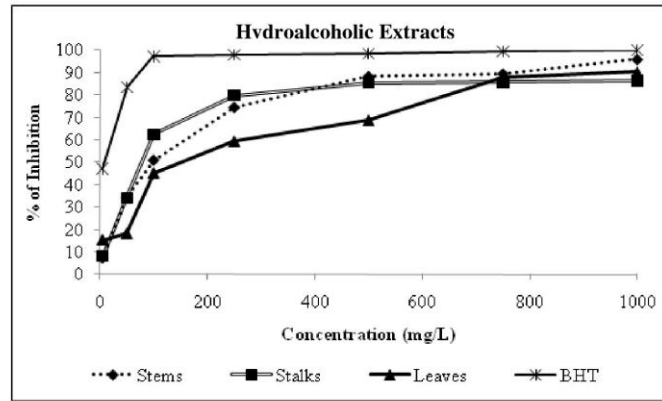


Fig. 3. Antioxidant activity of hydroalcoholic extracts measured by β -carotene bleaching test

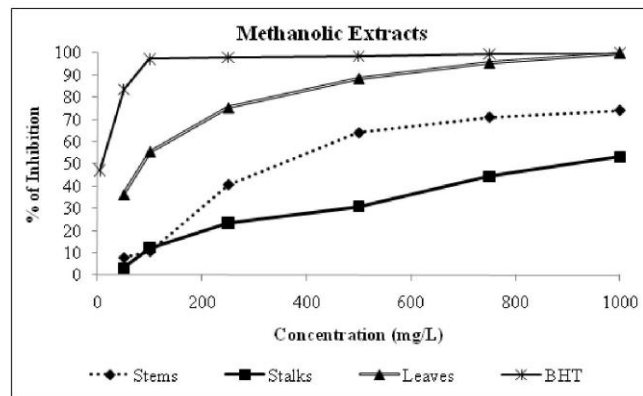


Fig. 4. Antioxidant activity of methanolic extracts measured by β -carotene bleaching test

In the case of acetone (Fig. 2) and methanolic (Fig. 4) extracts, the results were similar to those obtained for ethanolic extracts. In the case of hydroalcoholic extracts (Fig. 3), the extract of stems possessed the greatest antioxidant activity, but it was very identical to the antioxidant activity of extracts of stalks and leaves.

A. altissima is a potential source of natural occurring antioxidant compounds that can be used for medicinal or industrial purposes. However, the excess consumption of antioxidants can cause damage. Several studies summarized by Ristow and Schemesser (2011) evidence that several longevity-promoting interventions may converge by causing an activation of mitochondrial oxygen consumption to promote increased formation of ROS. These serve as molecular signals to exert downstream effects to ultimately induce endogenous defense mechanisms culminating in increased stress resistance and longevity,

an adaptive response more specifically named mitochondrial hormesis or mitohormesis (Ristow and Schemeisser 2011).

According to Fig. 5, it is possible to observe a positive linear correlation between antioxidant activity index and total phenolic content of all the extracts of *A. altissima* ($R^2=0.9593$). These results indicate that the phenolic compounds could be the main contributor of the antioxidant activities of this tree. This result was in agreement with previous studies (Fu et al. 2010). These authors showed results with a positive linear correlation between the antioxidant capacities and total phenolic content ($R^2>0.86$). The same analysis was done for the flavonoids (Fig. 5), and it was verified that there was no correlation ($R^2=0.2901$) between these compounds and the antioxidant activity of the extracts. It is known that only flavonoids of a certain structure and particularly hydroxyl position in the molecule determine antioxidant properties; in general these properties depend on the ability to donate a hydrogen or electron to a free radical (Miliauskas et al. 2004).

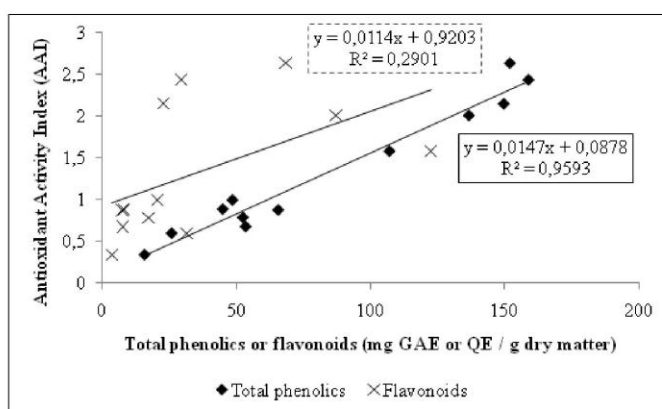


Fig. 5. Correlation between antioxidant activity, total phenolics and flavonoids of extracts

The RP-HPLC analysis was employed to identify major phenolic compounds in the extracts of *A. altissima*. These data will be helpful for comparison between the antioxidant activities and phenolic compounds of the different studied extracts and will also be useful for understanding their chemical constituents and functionality. RP-HPLC analysis is the most used method for identification of plant phenolics. Because of the diversity and complexity of natural phenolic compounds in hundreds of medicinal plant extracts, it is rather difficult to characterize every compound and elucidate its structure. It is not difficult, however, to identify major categories of phenolic compounds and representative phenolics. Namely, quercetin is an example of one flavonoid aglycone, and the *p*-coumaric and ferulic acids are examples of hydroxycinnamic acids (Cartea et al. 2011). In the present study, we conducted identification of representative natural phenolic compounds from selected extracts. In the Fig. 6 an example can be seen of an HPLC chromatogram of the standard phenolic compounds used in this study. The phenolic compounds were detected at 280 nm (although 320 and 350 nm were more adequate

wavelengths to detect hydroxycinnamic acids and flavonoids derivatives, respectively). A total of nine phenolic compounds were identified and quantified in the extracts of the plant (Table 4), including hydroxybenzoic acids, hydroxycinnamic acids, and flavonoids. The total amount of phenolic compounds in all the extracts was 268.15 mg / g of dry matter. Gallic acid is one of the most important hydroxybenzoic acids, which is a naturally abundant plant phenolic compound, and it is present in food of plant origin; since it was found to exhibit antioxidant properties, it has attracted considerable interest. Surprisingly, in the extracts now analyzed, gallic acid was the phenolic compound that was less abundant, having an occurrence percentage of 1.45%. The hydroxycinnamic acids identified (caffeic acid, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid, ferulic acid) were abundantly present. Ferulic acid was the most dominant hydroxycinnamic acid, presenting an occurrence percentage of 25.59%. These results are in agreement with other previously published data (Kelebek et al. 2009). Acetone was the solvent that extracted the lowest quantity of phenolics, at about 40.67 mg / g of dry matter. Methanol extracted the biggest concentration of phenolic compounds, at about 81.63 mg / g of dry matter. Generally, extracts from *A. altissima* leaves yielded more phenolic compounds, when compared with the extracts of stems and stalks.

Table 4. Phenolic Compounds in *A. altissima* Extracts Analyzed by HPLC

Solvent	Plant part	Standard Phenolic Compounds (mg / g dry matter) *								
		Gallic Acid	Vanillic Acid	Caffeic Acid	Chlorogenic Acid	Syringic Acid	<i>p</i> -Coumaric Acid	Ferulic Acid	Ellagic Acid	Quercetin
Ethanol	Stems	1.65 ± 0.16	2.59 ± 0.39	1.37 ± 0.14	1.81 ± 0.08	1.80 ± 0.24	1.18 ± 0.22	5.80 ± 0.28	4.08 ± 0.68	N/D
	Stalks	0.69 ± 0.06	0.96 ± 0.08	N/D	0.90 ± 0.03	N/D	0.82 ± 0.12	4.38 ± 0.09	0.74 ± 0.00	N/D
	Leaves	N/D	4.08 ± 0.24	2.82 ± 0.39	11.30 ± 0.17	2.53 ± 0.56	6.98 ± 0.83	14.21 ± 0.65	3.99 ± 0.12	N/D
Acetone	Stems	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	4.65 ± 0.69	3.93 ± 0.38	5.17 ± 0.21	N/D
	Stalks	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	2.43 ± 0.52	10.46 ± 0.61	N/D
	Leaves	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	3.99 ± 0.33	5.54 ± 0.28	4.50 ± 0.41
Hydroalcoholic	Stems	N/D	1.48 ± 0.09	0.59 ± 0.07	1.35 ± 0.20	3.17 ± 0.26	1.66 ± 0.09	4.80 ± 1.11	N/D	N/D
	Stalks	N/D	3.54 ± 0.65	2.84 ± 0.68	8.72 ± 0.82	1.43 ± 0.17	1.94 ± 0.00	3.09 ± 0.14	3.19 ± 0.38	1.03 ± 0.06
	Leaves	1.56 ± 0.16	1.49 ± 0.11	0.98 ± 0.07	4.41 ± 0.59	6.64 ± 0.62	2.48 ± 0.04	10.26 ± 0.77	4.52 ± 0.89	N/D
Methanol	Stems	N/D	0.57 ± 0.05	N/D	1.10 ± 0.12	0.87 ± 0.01	0.54 ± 0.03	1.23 ± 0.10	1.78 ± 0.13	N/D
	Stalks	N/D	1.48 ± 0.16	N/D	N/D	1.18 ± 0.08	0.72 ± 0.14	1.91 ± 0.14	0.85 ± 0.17	N/D
	Leaves	N/D	2.71 ± 0.25	0.90 ± 0.03	17.59 ± 0.49	2.02 ± 0.24	12.81 ± 0.71	12.58 ± 0.71	19.02 ± 0.77	1.77 ± 0.04

* Results in terms of mean ± standard deviation
N/D – Not detected

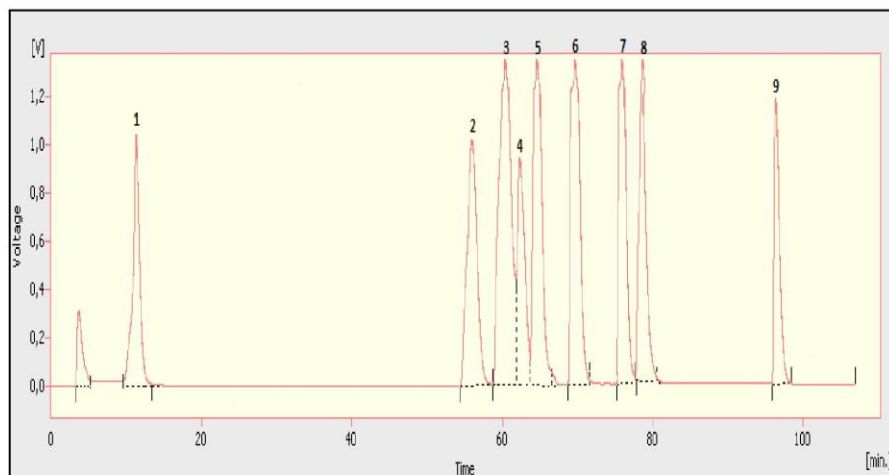


Fig. 6. Example of HPLC chromatogram of one mixture of the standard compounds used (1 mg/mL). Peaks: 1) gallic acid; 2) vanillic acid; 3) caffeic acid; 4) chlorogenic acid; 5) syringic acid; 6) *p*-coumaric acid; 7) ferulic acid; 8) ellagic acid; 9) quercetin.

CONCLUSIONS

1. *A. altissima* is a potential source of bioactive compounds with antioxidant activity, namely phenolic compounds and flavonoids. This species is also rich in alkaloids.
2. Extracts from leaves have greater amounts in phenolics than the other parts of this tree.
3. The mixture of water and ethanol is the solvent most suitable to extract substances with antioxidant activity.
4. There was a positive linear correlation between antioxidant activity index and total phenolic content of all the extracts of *A. altissima*.
5. Analysis by RP-HPLC shows that ferulic acid was the most dominant hydroxyl-cinnamic acid, presenting an occurrence percentage of 25.59%.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge Fundação Para a Ciência e a Tecnologia for the PhD. fellowship to Ângelo Luís (Reference: SFRH / BD / 65238 / 2009). The authors wish to thank to Prof. Dr. Dalila Espírito Santo and Dr. Paula Paes, from the Herbarium of the Instituto Superior de Agronomia (Jardim Botânico d' Ajuda, Lisboa), for the identification and deposit of the vouchers specimens of the plant species used in this work.

REFERENCES CITED

- Ahmadi, F., Sadeghi, S., Modarresi, M., Abiri, R., and Mikaeli, A. (2010). "Chemical composition, in vitro anti-microbial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* Beth., of Iran," *Food Chem. Toxicol.* 48, 1137-1144.
- Ali, S., Kasoju, N., Luthra, A., Singh, A., Sharanabasava, H., Sahu, A., and Bora, U. (2008). "Indian medicinal herbs as sources of antioxidants," *Food Res. Int.* 41, 1-15.
- Alim, A., Goze, I., Goze, H., and Tepe, B. (2009). "In vitro antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts of *Salvia cedronella* Boiss," *J. Med. Plants Res.* 3, 413-419.
- Andrade, D., Gil, C., Breitenfeld, L., Domingues, F., and Duarte, A. (2009). "Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L.," *Ind. Crops Prod.* 30, 165-167.
- Aruoma, O. (2003). "Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods," *Mutation Res.* 523-524, 9-20.
- Bardsley, D., and Edwards-Jones, G. (2007). "Invasive species policy and climate change: social perceptions of environmental change in the Mediterranean," *Environ. Sci. Policy.* 10, 230-242.
- Çam, M., Hışıl, Y., and Durmaz, G., (2009). "Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods," *Food Chem.* 112, 721-726.
- Cartea, M., Francisco, M., Soengas, P., and Velasco, P. (2011). "Phenolic compounds in brassica vegetables," *Molecules*. DOI:10.3390/molecules16010251.
- De Luca, V., and Pierre, B. (2000). "The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis," *Trend Plants Sci.* 5, 168-173.
- Feo, V., Martino, L., Quaranta, E., and Pizza, C. (2003). Isolation of phytotoxic compounds from tree-of-heaven (*Ailanthus altissima* Swingle)," *J. Agric. Food Chem.* 51, 1177-1180.
- Fernández-Arroyo, S., Barrañón-Catalán, E., Micol, V., Segura-Carretero, A., and Fernández-Gutiérrez, A. (2010). "High-performance liquid chromatography with diode array detection coupled to electrospray time-of-flight and ion-trap tandem mass spectrometry to identify phenolic compounds from a *Cistus ladanifer* aqueous extract," *Phytochem. Anal.* 21, 307-313.
- Fu, L., Xu, B., Xu, X., Qin, X., Gan, R., and Li, H. (2010). "Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China," *Molecules*. DOI:10.3390/molecules15128602.
- Kassim, M., Achoui, M., Mustafa, M., Mohd, M., and Yousoff, K. (2010). "Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity," *Nutrition Res.* 30, 650-659.
- Kelebek, H., Selli, S., Canbas, A., and Cabaroglu, T. (2009). "HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan," *Microchem. J.* 91, 187-192.
- Ksouri, R., Falleh, H., Megdiche, W., Trabelsi, N., Mhamdi, B., Chaieb, K., Bakrouf, A., Magné, C., and Abdelly, C. (2009). "Antioxidant and antimicrobial activities of the

- edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents,” *Food Chem. Toxicol.* 47, 2083-2091.
- Luis, A., Domingues, F., Gil, C., and Duarte, A. P. (2009). “Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica* spp.,” *J. Med. Plant Res.* 3, 886-893.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P., and van Beek, T. (2004). “Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts,” *Food Chem.* 85, 231-237.
- Murphy, M., Holmgren, A., Larsson, N., Halliwell, B., Chang, C., Kalyanaraman, B., Rhee, S., Thornalley, P., Partridge, L., Gems, D., Nyström, T., Belousov, V., Schumacker, P. and Winterbourn, C. (2011). “Unravelling the Biological Roles of Reactive Oxygen Species,” *Cell Metabol.* 13, 361-366.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S., and Shahabimajd, N. (2006). “Antioxidant activity, phenol and flavonoids contents of some selected Iranian medicinal plants,” *African J. Biotechnol.* 5, 1142-1145.
- Rahman, A., Kim, E. and Kank, S. (2009). “Antibacterial and antioxidant properties of *Ailanthus altissima* Swingle leaf extract to reduce foodborne pathogens and spoiling bacteria,” *J. Food Safety* 29, 499-510.
- Rajaei, A., Barzegar, M., Mobarez, A., Sahari, M., and Esfahani, Z. (2010). “Antioxidant, anti-microbial and antimutagenic activities of pistachio (*Pistachia vera*) gree hull extract,” *Food Chem. Toxicol.* 48, 107-112.
- Ristow, M. and Schmeisser, S. (2011). “Extending life span by increasing oxidative stress,” *Free Rad. Biol. Med.* 51, 327-336.
- Scherer, R., and Godoy, H. (2009). “Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method,” *Food Chem.* 112, 654-658.
- Silva, E., Souza, J., Rogez, H., Rees, J., and Larondelle, Y. (2007). “Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian regions,” *Food Chem.* 101, 1012-1018.
- Sreevidya, N., and Mehotra, S. (2003). “Spectrophotometric method for estimation of alkaloids precipitable with Dragendorff’s reagent in plant materials,” *JAOAC Int.* 86, 1124-1127.
- Surveswaran, S., Cai, Y., Corke, H., and Sun, M. (2007). “Systematic evaluation of natural phenolic antioxidant from 133 Indian medicinal plants,” *Food Chem.* 102, 938-953.
- Tarnawski, M., Depta, K., Grejcium, D., and Szelepin, B. (2006). “HPLC determination of phenolic acids and antioxidant activity in concentrated peat extract - A natural immunomodulator,” *J. Pharm. Biomed. Anal.* 41, 182-188.
- Tawaha, K., Alali, F., Gharaibeh, M., Mohammad, M., and El-Elimat, T. (2007). “Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian species,” *Food Chem.* 104, 1372-1378.

Article submitted: January 12, 2012; Peer review completed: March 16, 2012; Revised version received and accepted: March 18, 2012; Published: March 22, 2012.

2.3. Propriedades anti-microbianas, anti-biofilme e citotóxicas de extratos de *Hakea sericea*

Artigo 3

Antimicrobial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Hakea sericea* Schrader extracts

Ângelo Luís, Luiza Breitenfeld, Susana Ferreira, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues

Pharmacognosy Magazine, Volume 10, Issue 37 (Supplement), S6 - S13, 2014

Antimicrobial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Hakea sericea* Schrader extracts

Ângelo Luís, Luiza Breitenfeld, Susana Ferreira, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues

CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal

Submitted: 22-10-2012

Revised: 03-12-2012

Published: 21-02-2014

ABSTRACT

Background: *Hakea sericea* Schrader is an invasive shrub in Portuguese forests. **Objective:** The goal of this work was to evaluate the antimicrobial activity of *H. sericea* extracts against several strains of microorganisms, including the ability to inhibit the formation of biofilms. Additionally the cytotoxic properties of these extracts, against human cells, were assessed. **Materials and Methods:** The antimicrobial activity of the methanolic extracts of *H. sericea* was assessed by disk diffusion assay and Minimum Inhibitory Concentration (MIC) value determination. The antibiofilm activity was determined by quantification of total biofilm biomass with crystal violet. Cytotoxicity was evaluated by hemolysis assay and 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) test. **Results:** For Gram-positive bacteria, MIC values of *H. sericea* methanolic extracts ranged between 0.040 and 0.625 mg/mL, whereas the fruits extract yielded the lowest MIC for several strains of microorganisms, namely, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* and clinical methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA). Stems and fruits extract at 2.5 mg/mL effectively eradicated the biofilm of *S. aureus* ATCC 25923, SA 01/10 and MRSA 12/10. Regarding leaves extract, hemolysis was not observed, and in the case of stems and fruits, hemolysis was verified only for higher concentrations, suggesting its low toxicity. Fruits extract presented no toxic effect to normal human dermal fibroblasts (NHDF) cells however for concentrations of 0.017 and 0.008 mg/mL this extract was able to decrease human breast adenocarcinoma cells (MCF-7) viability in about 60%, as MTT test results had confirmed. This is a clearly demonstrator of the cytotoxicity of this extract against MCF-7 cells.

Key words: Antibiofilm, Antimicrobial, Cytotoxicity, *Hakea sericea*

Access this article online

Website:
www.phcog.com

DOI:
10.4103/0973-1296.127331

Quick Response Code:



INTRODUCTION

The rise in antibiotic-resistant microorganism in recent years has led to an increasing search for new antibiotics.^[1] In general, it has been possible to observe an increase in resistance of pathogenic viruses, bacteria, fungi and protozoa against known drugs.^[2] Moreover, bacteria that adhere to implanted medical devices or damaged tissue can become the cause of persistent infections. These bacteria encase themselves in a hydrated matrix of polysaccharide and protein, forming a slimy layer known as a biofilm.^[3] This mechanism increases the resistance to antibiotics and difficult the eradication of microorganism. To overcome the drawbacks of the current antimicrobial drugs and to

obtain more efficacious drugs, an antimicrobial drug having a novel mode of action should be developed.^[2] All over the world, people depended on herbs for the treatment of various ailments before the advent of modern medicine. Medicinal plants constitute an arsenal of chemicals that could be exploited by human to prevent microbial invasion.^[4] Secondary metabolites produced by plants constitute a major source of bioactive substances. The scientific interest in these metabolites has increased today with the search of new therapeutic agents from plant source, due to the increasing development of the resistance pattern of microorganisms to most currently used antimicrobial drugs.^[5] In a search for plant-derived biologically active compounds against infectious diseases, this work analyses the potential antimicrobial activity of *Hakea sericea* Schrader methanolic extracts. *H. sericea* is an invasive shrub in Portuguese forests. Originally from southern Australia, it was introduced in Portugal for ornamental purposes. A key characteristic of *H. sericea* is its extreme serotinous habit: all of its seeds are

Address for correspondence:
Prof. Fernanda Domingues, CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal.
E-mail: fdomingues@ubi.pt

retained in pairs in tough woody follicles, which accumulate along the branches throughout the life of the plant.^[6] In a previous report of our team, we have made an exhaustive study of several shrubs extracts, including *H. sericea*.^[7] This shrub had demonstrated very good antioxidant properties, namely radical scavenging activity of DPPH free radicals and the inhibition of oxidation of linoleic acid molecules, which is an indicator of inhibition of lipid peroxidation.^[7] These antioxidant properties are mainly due to the presence of phenolics, tannins and flavonoids.^[7] In our previous work we have analyzed the phenolic composition of *H. sericea* extracts using RP-HPLC and the main compounds present in extracts were ferulic and *p*-coumaric acids.^[7] Moreover, other phenolic compounds commonly found in plants were identified and quantified in *H. sericea* methanolic extracts, for example, gallic, caffeic and chlorogenic acids.^[7] We have also found that *H. sericea* possesses high concentrations of some secondary metabolites, namely alkaloids, among the others above mentioned.^[7] These substances are well known bioactive compounds from plants. To the best of our knowledge, no other phytochemical characterization about this plant has been published yet. In this sense, the goal of this work was to evaluate the antimicrobial activity of *H. sericea* extracts against several strains of microorganism, as well as studying the ability to inhibit the formation of biofilms. Additionally the cytotoxic properties of this extracts, against human cells, were assessed.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Aerial parts (stems, leaves and fruits) of *H. sericea* were collected in Serra da Estrela (GPS coordinates: N 40°20.296'; W 07°27.491'; Altitude: 730 m). Plant materials were dried at 35°C in a ventilated oven during 48h and reduced to coarse powder (<2 mm) using a laboratory cutting mill. Harvesting, transport and storage of plant species were authorized by *Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade*, because this plant is an exotic, invasive and non-indigenous species. This vegetal species was identified by a botanist and a voucher specimen (No. LISI 13/2011) has been deposited in the Herbarium of the *Instituto Superior de Agronomia (Jardim Botânico d'Ajuda, Lisboa)*.

Extraction procedure

Methanolic extracts were obtained with Soxhlet apparatus until the solvent became colorless, using approximately 100g of raw material and 1000mL of solvent. The extract solutions were filtered under vacuum using a crucible of porosity #2 and then distilled under reduced pressure until a final volume of solvent of 100mL. Prior to use, the extracts were dried using rotary evaporator under reduced pressure and then dissolved in dimethylsulphoxide (DMSO).

Determination of antimicrobial activity

Test microorganisms and culture media

The antimicrobial studies were carried out against eight bacterial strains (Gram-positive: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 11778 and *Listeria monocytogenes* LMG 16779; Gram-negative: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883; Clinical methicillin-resistant *S. aureus* MRSA 10/08 and MRSA 12/08) and two yeast strains (*Candida albicans* ATCC 90028 and *Candida tropicalis* ATCC 750). For antibiofilm activity assays, an additional four clinical strains of *S. aureus* were used (SA 01/10, SA 02/10, SA 03/10 and SA 08). Stock cultures were prepared and stored with 20% glycerol at -80°C. The strains were sub-cultured on an appropriate agar plate 24 h prior to any antimicrobial test and when cultured from stock, they were sub-cultured before use. Brain Heart Infusion Agar (BHI) was used for the growth of bacterial species and Sabouraud Dextrose Agar (SDA) was used for yeasts. Müeller-Hinton Agar (MHA) was used for the disc diffusion assays and for Minimum Inhibitory Concentration (MIC) determination against all microorganism. Regarding the disc diffusion with yeasts, MHA with 2% glucose and 0.5 µg/mL blue methylene was used, whereas MHA with 2% glucose was used to determine the MIC.

Disc diffusion assay

Antimicrobial activity of the crude methanolic extracts of stems, leaves and fruits of *H. sericea* was determined by disk diffusion assay, using either the M2-A8 method, described by Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI), for bacteria or the M44-A2 method described by CLSI for yeasts.^[8,9] For the preparation of inoculum, bacteria or fungi were suspended in saline solution to a cell suspension of 0.5 McFarland (about 1 to 2×10⁸ colony-forming unit/mL (CFU/mL) to non-fastidious bacteria and 1 to 5×10⁶ CFU/mL for yeasts). The dried plant extracts were dissolved in DMSO. The discs (6 mm diameter) were impregnated with 20 µL of the extract (4 mg/disc) at a concentration of 200 mg/mL and placed on the inoculated agar. Negative controls were prepared using DMSO as was used to dissolve the plant extracts. Positive controls were prepared using tetracycline (30 µg/disc) in the case of bacteria and amphotericin B (25 µg/disc) in the case of yeasts. The plates inoculated with non-fastidious bacteria were incubated at 37°C for 24 h and for 48 h in the case of yeasts. After incubation, all plates were checked for inhibition zones and the diameters were measured in millimeters. All experiments were carried out in triplicate.

Determination of MIC by agar dilution method

The non-fastidious reference bacteria and isolates were tested according to the M7-A6 protocol, published by CLSI.^[10] According to this protocol, each extract was diluted

Luis, et al.: Biological activities of *H. sericea*

and incorporated into MHA to create a series of plates with concentrations ranging from 2.5 to 0.01 mg/mL. 2 µL of 1:10 dilution of a suspension with an equivalent turbidity of 0.5 McFarland were used to inoculate the agar in order to achieve 10⁴ CFU per spot. After incubation for 24 h at 37°C, the plates were visually inspected to determine either the growth or inhibition on the surface of each dilution plate. Medium without the tested extracts were inoculated with the strain cultures and used as controls. The MIC was defined as the lowest concentration of antimicrobial agent which prevented visible growth. The experiments were repeated three times and the results were determined by the modal value. In the case of yeasts, the protocol above mentioned was slightly modified, the medium MHA was supplemented with 2% glucose and the time of incubation was increased to 48 h.

Antibiofilm activity

Antibiofilm activity was determined according to Raja *et al.*, 2011 with some modifications.^[11] In brief, the biofilms of seven strains of *S. aureus* (ATCC 25923, MRSA 10/08, MRSA 12/08, SA 01/10, SA 02/10, SA 03/10 and SA 08) were prepared in 96-well flat-bottom polystyrene microtiter plates. The bacterial suspensions were prepared from the overnight grown culture (37°C, 250rpm) and the turbidity of the suspension was adjusted to 0.7 O.D. at 610nm (~1 × 10⁹ CFU/mL). Twofold serial dilutions of *H. sericea* extracts were prepared in 100 µL volume of tryptone soya broth (TSB) supplemented with 0.5% glucose in the wells of 96-well flat bottom microtiter plate. 40 µL of fresh TSB with 0.5% glucose was added to each well, followed by the addition of 60 µL of above bacterial suspension. This resulted in final inoculums of 6 × 10⁷ CFU/mL in each well; the final concentrations of the extracts ranged from 2.5 to 0.08 mg/mL. The plate was incubated 24 h at 37°C. After incubation, the planktonic cells were removed from each well by washing two times with 200 µL of phosphate buffer saline (PBS). The biofilms were fixed with 200µL of methanol for 20 min, stained with 100 µL of 0.1% (wt/vol) crystal violet for 10 min and rinsed thoroughly three times with 200 µL of water. Negative control was prepared as mentioned above replacing the inoculum volume by TSB. Biofilm formation was quantified by the addition of 200 µL of 95% ethanol to the crystal violet stained cells and then 100 µL was removed for recording the absorbance at 595nm using a microplate reader.^[11] This procedure was done, at least three independent times.

Cytotoxic evaluation

Hemolysis assay

Freshly obtained EDTA human blood (A, Rh+) was washed three times by centrifugation (2500 rpm for 10 min) in PBS at room temperature (20-25°C). Buffy coat was

removed of the pellet and a 10% of red blood cells (RBC) suspension was prepared in PBS (1×), aliquots of 2.5 mL of 10% RBC suspension plus 500 µL of *H. sericea* extracts at three different concentrations 0.5, 5 and 50 mg/mL were shaken in a waterbath at 37°C. Next, 40 µL of 2.5% glutaraldehyde was added to 1mL of the mixture at 20 and 40 min to terminate the reaction. After that, they were centrifuged at 2500 rpm for 15 min to allow broken membranes and unbroken cells to settle at the bottom. For 100% hemolysis or positive control, 500 µL of 0.2% Triton (in PBS) was added to 2.5 mL of 10% RBC suspension. The supernatant was removed and the liberated hemoglobin in the supernatant was measured spectrophotometrically as absorbance at 541 nm. For negative control (0% hemolysis) only 500µL of PBS and 2.5 mL of 10% RBC suspension were used and DMSO control was done mixing 500 µL of 25% DMSO with 10% of RBC suspension. The experiment was done in triplicate and mean ± standard deviation was calculated as follows: % Hemolysis = (Absorbance sample / Absorbance positive control) × 100.^[12]

MTT test

Cells were routinely maintained at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. Normal human dermal fibroblasts (NHDF) were cultured in RPMI-1640 medium supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), HEPES (0.01M), L-glutamine (0.02M), sodium pyruvate (0.001M) and 1% antibiotic/antimycotic (10000 units/mL penicillin, 10 mg/mL streptomycin and 25 µg/mL amphotericin B). Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) high glucose supplemented with 10% FBS and 1% antibiotic/antimycotic was used to culture human breast adenocarcinoma cells (MCF-7). All the cells were used between passages 3 to 10 in the experiments. Cell viability in the presence of *H. sericea* extracts was studied using the method of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) according to a previous described procedure with slight modifications.^[13] Briefly, 500 µL of cells were seeded in 24-well plates (2 × 10⁴ cells/well) in the culture medium containing FBS and after 48h they were treated with 500 µL of four different concentrations (0.5, 0.167, 0.017 and 0.008 mg/mL) of *H. sericea* extracts for 48h, with untreated cells serving as control. At the end of incubation the media in the wells was removed and replaced with 300 µL of MTT solution in fresh media and incubated at 37°C for 4h. Thereafter, media-containing MTT was removed and formazan crystals were dissolved in 300 µL of DMSO and 20 µL of glycyl-glycine buffer (for stabilizing the colour) were added. Then, 200 µL of the mixture above mentioned was removed and absorbance was recorded in microplate reader at 570 nm.^[14] The experiment was carried out in triplicate and the extent of cell death was expressed as the percentage of cell viability in comparison with control cells.

RESULTS AND DISCUSSION

In this work, the antimicrobial activity of *H. sericea* methanolic extracts against several strains of human infecting microorganism was evaluated. Moreover the antibiofilm activity and cytotoxic properties of the extracts were studied. In our previous work we have analyzed the phenolic composition of *H. sericea* extracts using RP-HPLC and the main compounds present in extracts were ferulic and *p*-coumaric acids.^[7] Moreover, other phenolic compounds commonly found in plants were identified and quantified in *H. sericea* methanolic extracts.^[7]

The diameters of inhibition zones for *H. sericea* extracts, measured by disc diffusion assay, are presented in Table 1. The strain of *C. albicans* was not inhibited by the extracts and the extract of fruits does not inhibit the growth of *P. aeruginosa*. Generally, Gram-positive bacteria presented more susceptibility to all *H. sericea* extracts than Gram-negative and yeast strains. The fruits extract is the one which promotes less growth inhibition when compared with the extracts of the other parts of *H. sericea*. Contrarivise, all strains tested are more susceptible to the stems extract, namely *S. aureus* with an inhibition zone of 19.50 mm. The growth of *L. monocytogenes* was largely inhibited by all studied extracts. Relatively to the solvent used to dissolve the extracts, DMSO does not inhibit the growth of the microorganisms tested. In the case of conventional antibiotic and antifungic, respectively tetracycline and amphotericin B, the biggest diameters of inhibition zones were found. The results obtained by disc diffusion were promissory and indicate the potential use of these extracts as antimicrobials.

The minimum inhibitory concentrations of extracts were determined by agar dilution method and the results are presented in Table 2. The Gram-positive strains present lower MIC values than Gram-negative and yeast strains which indicates that Gram-positive bacteria were the most susceptible strains to the *H. sericea* extracts. The difference in susceptibility between the Gram-negative and Gram-positive bacteria to inhibition by plant extracts is supported by other researchers.^[15,16] It is not known exactly why Gram-negative bacteria should be less susceptible but it may be related to the outer membrane of Gram-negative bacteria which endows the bacterial surface with strong hydrophilicity and acts as a strong permeability barrier.^[16] The morphological differences between Gram-positive and Gram-negative bacteria could justify the different sensitivity, namely because Gram-negative bacteria have an outer phospholipidic membrane carrying the structural lipopolysaccharide components, which cannot be found in Gram-positive bacteria. This makes the cell wall impermeable to lipophilic solutes, while porins constitute

a selective barrier to the hydrophilic solutes with an exclusion limit of about 600 Da.^[15] The Gram-positive bacteria should be more susceptible to the bioactive compounds. Another explanation may be the inhibition of the peptidoglycan synthesis in Gram-positive bacteria, by compounds present in the extracts.^[15] In the case of Gram-positive bacteria, MIC values of *H. sericea* methanolic extracts ranged between 0.040 and 0.625 mg/mL, whereas the fruits extract is the one with lowest MIC for several strains of microorganisms, namely, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* and clinical MRSA 10/08 and MRSA 12/08, which indicates a possible high antimicrobial activity. Surprisingly, this extract is the one with smaller inhibition zones; this fact can be probably due to the presence of compounds in this extract which are difficult to spread on the agar surface, but when they are diluted in agar present a high antimicrobial activity. The results now obtained for MIC values were smaller than the ones obtained by Ferreira et al., 2011 in their study of antimicrobial activity of extracts *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo*, which are also shrubs of Portuguese forests.^[17] Moreover, fruits extract had a significant activity against some food-borne pathogens, *B. cereus* and *L. monocytogenes*, indicating a potential use of this plant extracts as food preservative.

In addition, since the extracts presented low MIC values for *S. aureus* strains, including clinical MRSA strains, it was decided to evaluate the antibiofilm activity of them. Biofilms are communities of surface-associated microorganisms embedded in a self-produced extracellular polymeric matrix that are notoriously difficult to eradicate and are a source of many recalcitrant infections.^[11] Staphylococci are known to form biofilms on an implanted medical device or damaged tissues and these biofilms are difficult to disrupt.^[11] The effect of *H. sericea* extracts on *S. aureus* biofilm formation is presented in Table 3. These extracts effectively inhibited the biofilm formation of all studied strains of *S. aureus*, except in the case of minor concentrations of fruits extract for *S. aureus* ATCC 25923, probably because in the antibiofilm assay a greater number of CFU was used than in the determination of MIC, and in this sense the extract concentration available to act on the microorganisms is reduced; or because the sub-MIC concentrations can induce stress to the bacterial cells and promote the biofilm formation. Generally, the inhibition of *S. aureus* biofilm formation corresponds to the inhibition of bacterial growth or cell death, but interestingly, for sub-MIC concentrations the formation of biofilms is also inhibited. Stems extract at 2.5 mg/mL effectively eradicated the biofilm of reference strain of *S. aureus* and SA 01/10. The total eradication of biofilm was also observed for fruits extract (2.5 mg/mL) to MRSA 12/10 which is in agreement with MIC value of this extract for that strain (0.08 mg/mL). To the best of our knowledge, this is the first report to

Luis, et al.: Biological activities of *H. sericea*

Table 1: Diameter of inhibition zone (mm) of *H. sericea* methanolic extracts and controls. The results are expressed in terms of mean±standard deviation

Plant part/ control	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>L. monocytogenes</i> LMG 16779	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028
Stems	19.50±0.50	13.00±0.00	15.67±0.58	8.33±0.58	10.50±0.71	12.33±0.58	15.67±0.58	6.00±0.00
Leaves	16.50±0.50	12.50±0.50	17.67±0.58	7.67±0.58	9.00±0.71	11.50±0.50	11.50±0.50	6.00±0.00
Fruits	10.00±0.00	11.00±0.00	14.67±0.58	6.50±0.50	6.00±0.00	10.67±0.58	9.50±0.50	6.00±0.00
Tetracycline	30.25±0.50	30.00±0.82	18.25±0.60	23.25±0.50	11.50±0.58	22.25±0.50	-	-
Amphotericin B	-	-	-	-	-	-	21.50±0.58	20.33±0.58
DMSO	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00	6.00±0.00

DMSO: Dimethylsulphoxide; ATCC: American type culture collection

Table 2: MIC values (mg/mL) of *H. sericea* methanolic extracts. The results are expressed as modal values

Plant part	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>B. cereus</i> ATCC 11778	<i>L. monocytogenes</i> LMG 16779	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	MRSA 10/08	MRSA 12/08
Stems	0.315	0.625	0.315	2.500	1.250	0.625	1.250	1.250	1.250	2.500
Leaves	0.625	1.250	0.315	>2.500	2.500	1.250	2.500	2.500	1.250	>2.500
Fruits	0.155	0.040	0.040	>2.500	2.500	>2.500	>2.500	>2.500	0.315	0.080

MIC: Minimum inhibitory concentration; ATCC: American type culture collection

Table 3: Effect of *H. sericea* extracts on the biofilm formation. The results are expressed as mean±standard deviation of optical density readings for crystal violet assays

Extracts	Plant part	Concentration (mg/mL)	Strains							
			<i>S. aureus</i> ATCC 25923	MRSA 10/08	MRSA 12/08	SA 01/10	SA 02/10	SA 03/10	SA 08	
Stems	2.5		0.18±0.04	0.30±0.06	0.43±0.04	0.27±0.06	0.41±0.06	0.62±0.15	0.62±0.06	
		1.25	0.63±0.11	0.55±0.09	0.50±0.04	0.45±0.12	0.49±0.13	0.76±0.13	0.69±0.15	
	0.625		0.74±0.15	0.60±0.13	0.52±0.10	0.62±0.15	0.79±0.10	0.80±0.08	0.80±0.12	
		0.315	0.78±0.10	0.77±0.09	0.62±0.12	0.85±0.08	1.07±0.08	0.86±0.15	1.03±0.19	
	0.156		0.85±0.10	0.80±0.17	0.79±0.07	0.87±0.17	1.21±0.08	1.30±0.10	1.30±0.15	
		0.08	0.98±0.13	0.87±0.11	0.93±0.12	1.00±0.10	1.35±0.08	1.35±0.14	1.35±0.20	
	Positive control		1.27±0.15	1.19±0.15	1.01±0.18	1.70±0.19	1.50±0.13	1.50±0.15	1.50±0.16	
		Negative control	0.16±0.02	0.16±0.02	0.17±0.02	0.21±0.10	0.15±0.01	0.14±0.02	0.15±0.02	
	Leaves	2.5		0.38±0.05	0.42±0.07	0.27±0.02	0.64±0.10	0.66±0.08	0.77±0.16	0.36±0.11
			1.25	0.47±0.02	0.52±0.07	0.29±0.05	0.70±0.10	0.72±0.10	0.80±0.04	0.42±0.16
0.625			0.58±0.09	0.60±0.06	0.39±0.07	0.75±0.23	0.80±0.14	0.80±0.19	0.47±0.16	
		0.315	0.71±0.10	1.00±0.10	0.77±0.11	1.10±0.17	1.07±0.20	1.01±0.18	0.72±0.10	
0.156			1.01±0.16	1.10±0.10	1.20±0.11	1.12±0.22	1.10±0.15	1.30±0.16	0.72±0.11	
		0.08	1.08±0.15	1.16±0.12	1.30±0.10	1.24±0.20	1.20±0.15	1.35±0.21	0.72±0.06	
Positive control			1.26±0.15	1.20±0.14	1.35±0.15	1.25±0.20	1.30±0.22	1.50±0.11	0.84±0.18	
		Negative control	0.15±0.02	0.16±0.02	0.16±0.01	0.15±0.02	0.14±0.02	0.16±0.02	0.14±0.01	
Fruits		2.5		0.65±0.10	0.33±0.06	0.21±0.10	0.31±0.01	0.55±0.16	0.72±0.14	0.58±0.12
			1.25	0.66±0.18	0.32±0.13	0.26±0.07	0.31±0.03	0.55±0.17	0.80±0.18	0.76±0.20
	0.625		0.67±0.16	0.61±0.12	0.28±0.07	0.53±0.10	0.80±0.16	1.20±0.05	0.77±0.18	
		0.315	1.05±0.16	0.74±0.10	0.87±0.10	0.96±0.12	0.92±0.20	1.35±0.07	1.07±0.17	
	0.156		1.33±0.07	0.83±0.12	0.99±0.09	0.98±0.15	1.10±0.15	1.41±0.16	1.08±0.15	
		0.08	1.65±0.09	0.86±0.13	1.10±0.16	0.99±0.13	1.20±0.10	1.47±0.18	1.10±0.09	
	Positive control		1.23±0.19	1.19±0.15	1.20±0.17	1.10±0.20	1.30±0.10	1.55±0.11	1.20±0.09	
		Negative control	0.13±0.01	0.14±0.01	0.17±0.10	0.19±0.06	0.18±0.03	0.20±0.05	0.17±0.07	

ATCC: American type culture collection; MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*; SA: *S. aureus*

provide the evidence of the antimicrobial activity of *H. sericea* and more specifically about its potential to prevent as well as to reduce the *S. aureus* biofilms formation.

Given such a good antibacterial activity of *H. sericea* extracts, namely its action against *S. aureus* biofilms, we can anticipate the use of these extracts for medical

purposes, as disinfectants, or for industrial purposes, as additives to prevent microbial growth. To be considered as such, these extracts cannot be cytotoxic, or its toxicity must be poor. The toxicity of *H. sericea* extracts was accessed by hemolysis assay and MTT test. The mechanical stability of the erythrocytic membrane is a good indicator of the effect of various *in vitro* damages levied on it by various compounds for screening of cytotoxicity and is dependent on their physical and structural properties.^[12] The Figure 1a-c represents the percentage of hemolysis of extracts. In the case of stems and fruits extracts only for 50 mg/mL, high percentage of hemolysis was caused but it is much higher concentration than MIC value. There are no significant differences between the percentage of hemolysis at 20 and 40 min of the assay. The results for the hemolysis assay were similar to those previously published about another plant extracts.^[18]

Cytotoxicity evaluation of extracts was completed with cell viability study with MTT test. MTT is a yellow, water-soluble tetrazolium salt. The reduction of MTT by the succinate dehydrogenase system of mitochondria in metabolically active cells yields a water-insoluble purple formazan product.^[19] Fibroblasts (NHDF) and epithelial cancer cells (MCF-7) were used in the present

study. Fibroblasts are mesenchymal cells with many vital functions during development and in adult organisms. They are among the most accessible normal mammalian cell types and are used as a model for cancer initiation and progression mechanisms.^[20] In addition, to evaluate the potential anticarcinogenic properties of *H. sericea* extracts, a human breast adenocarcinoma cell line (MCF-7) was used. Figure 2a presents the relative cell viability of NHDF and MCF-7 cells incubated with stems extract, in concentrations ranging from 0-0.5 mg/mL. This extract displayed bioactivity on MCF-7 cells, decreasing cells viability by about 40%. For NHDF cells, stems extract presents no cytotoxic properties. In this sense, it can be said that this extract presents a selective toxicity because its bioactivity was only observed in MCF-7 cells, even in small concentrations. The leaves extract [Figure 2b] are able to promote NHDF cells viability, which is a different form of toxicity, and it can be considered a carcinogenic extract. However, for MCF-7 cells decreased viability was observed. The most surprisingly results were found in *H. sericea* fruits extract [Figure 2c]. This extract presented no toxicity towards NHDF cells, because its viability is not altered in the presence of this extract but for MCF-7 cells, 0.017 and 0.008 mg/mL, this extract was able to decrease mitochondrial dehydrogenases activity in about 60% as MTT test results had demonstrated,

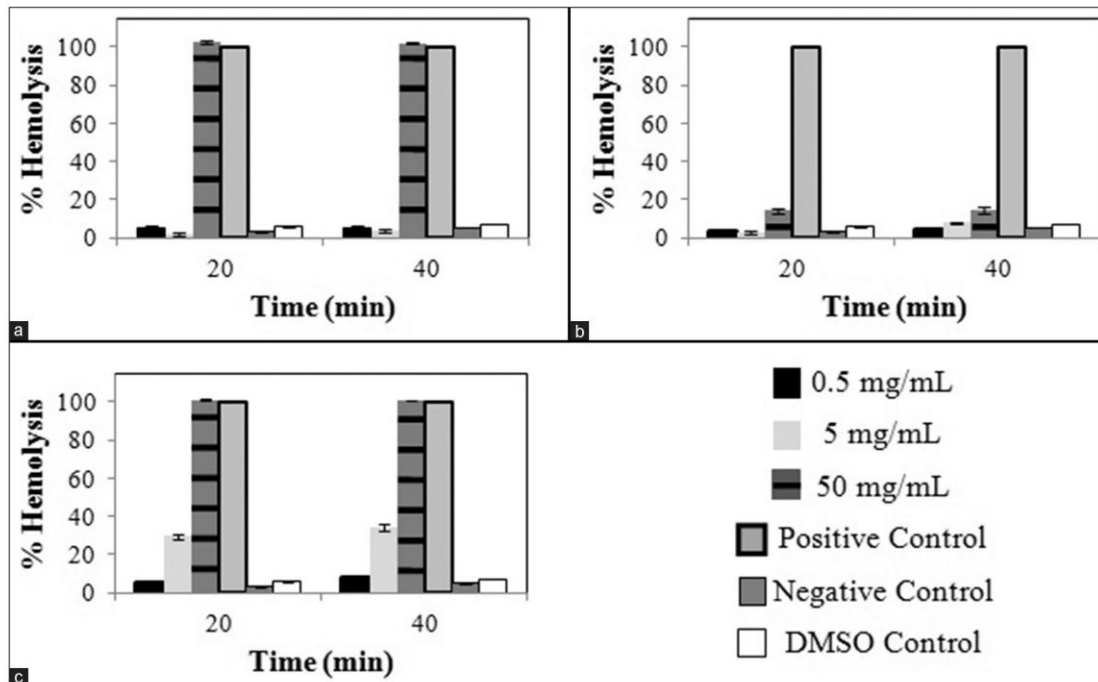


Figure 1: Percentage of hemolysis in the presence of different concentrations of extracts: (a) stems; (b) leaves; (c) fruits (mean values \pm standard deviation)

Luis, et al.: Biological activities of *H. sericea*

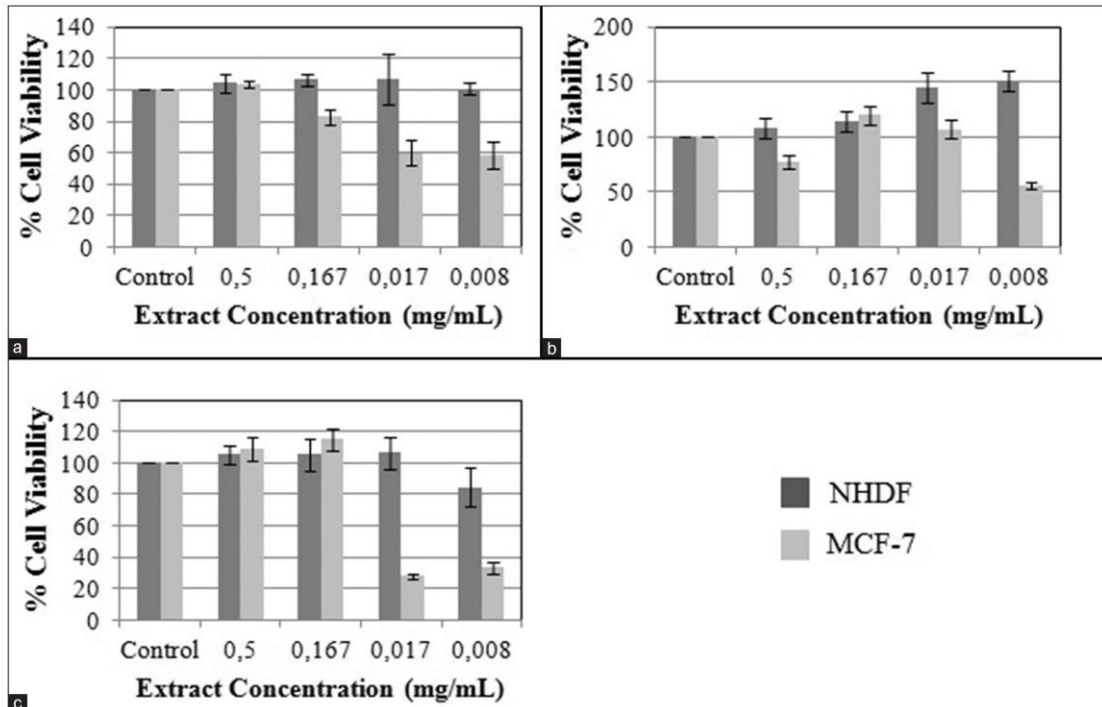


Figure 2: Relative cell viability of NHDF and MCF-7 cells incubated with extracts, in concentrations ranging from 0-0.5 mg/mL: (a) stems; (b) leaves; (c) fruits (mean values \pm standard deviation)

indicating a relevant cytotoxicity towards these cancer cells. These results allow us to conclude that fruits extract probably can be used as anticarcinogenic agent. These changes in cell viability promoted by vegetal extracts were also observed by other authors.^[21] In sum, *H. sericea* extracts should be considered to treat human infections because of its important biological activities and low cytotoxic effects in human cells. In future works it will be important to identify the compounds present in the extracts, responsible for the above mentioned biological activities.

CONCLUSION

In sum *H. sericea* is a potential source of bioactive compounds with antimicrobial activity, namely against several *S. aureus* strains, including clinical MRSA. The antibiofilm activity of *H. sericea* extracts in *S. aureus* biofilm formation was also demonstrated. Generally *H. sericea* presents no toxic properties, in active concentrations, against human erythrocytes. Fruits and leaves extracts presents selective toxicity decreasing MCF-7 cells viability, indicating potential anticarcinogenic properties. As far as we know this is the first report about biological activities of *H. sericea*.

ACKNOWLEDGMENTS

Ángelo Luís acknowledges a PhD fellowship from *Fundação Para a Ciência e a Tecnologia* (Reference: SFRH/BD/65238/2009), co-funded by *Fundo Social Europeu* (QREN-POPH) and by national funds of *Ministério da Educação e Ciência*. Authors wish to thank to Prof. Dr. Dalila Espírito Santo and Dr. Paula Paes, from the Herbarium of the *Instituto Superior de Agronomia (Jardim Botânico d'Ajuda, Lisboa)*, for the identification and deposit of the vouchers specimens of the plant species used in this work. This work was partially supported by the project PEst-C/SAU/UI0709/2011 funded by *Fundação para a Ciência e a Tecnologia* through the program COMPETE.

REFERENCES

- O'Donnell F, Smyth T, Ramachandran V, Smyth W. A study of the antimicrobial activity of selected synthetic and naturally occurring quinolines. *Int J Antimicrob Agents* 2010;35:30-8.
- Orhan D, Özçelik B, Özgen S, Ergun F. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids. *Microbiol Res* 2010;165:496-504.
- Stewart P, Costerton J. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. *Lancet* 2001;358:135-8.
- Kuete V, Fozing D, Kapche W, Mbaveng A, Kuiate J, Ngadjui B, et al. Antimicrobial activity of the methanolic extract and compounds from *Morus mesozygia* stem bark. *J Ethnopharmacol* 2009;124:551-5.

Luis, *et al.*: Biological activities of *H. sericea*

- Mbosso E, Ngouela S, Nguedia J, Beng V, Rhomer M, Tsamo E. *In vitro* antimicrobial activity of extracts and compounds of some selected medicinal plants from Cameroon. *J Ethnopharmacol* 2010;128:476-81.
- Le Maitre D, Krug R, Hoffmann J, Gordon A, Mgidi T. *Hakea sericea*: Development of a model of the impacts of biological control on population dynamics and rates of spread of an invasive species. *Ecol Model* 2008;212:342-58.
- Luis Á, Domingues F, Duarte AP. Bioactive compounds, RP-HPLC analysis of phenolics, and antioxidant activity of some Portuguese shrub species extracts. *Nat Prod Commun* 2011;6:1863-72.
- CLSI, 2003. M2-A8, Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada-Oitava Edição. 23,1.
- CLSI, 2008. M44-A2, Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts.
- CLSI, 2003. M7-A6, Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada-Sexta Edição. 23,2.
- Raja A, Ali F, Khan I, Shwal, A, Arora D, Shah B, *et al.* Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of acetyl-11-keto- β -boswellic acid from *Boswellia serrata*. *BMC Microbiol* 2011;11:54-62.
- Sharma P, Sharm J. *In vitro* hemolysis of human erythrocytes – by plant extracts with antiplasmodial activity. *J Ethnopharmacol* 2001;74:239-43.
- Freshney R. *Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications*. 6th ed. Scotland: Wiley; 2010.
- Cruz C, Cairão E, Silvestre S, Breitenfeld L, Almeida P, Queiroz J. Targeting of mitochondria-endoplasmic reticulum by fluorescent macrocyclic compounds. *PLoS One* 2011;6:e27078.
- Nostro A, Germanò M, D'Angelo V, Marino A, Cannatelli M. Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity. *Lett Appl Microbiol* 2000;20:379-84.
- Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Lett Appl Microbiol* 1998;26:118-22.
- Ferreira S, Santos J, Duarte A, Duarte AP, Queiroz J, Domingues F. Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts. *Nat Prod Res* 2012;26:1558-60.
- Toledo C, Britta E, Ceole L, Silva E, Mello J, Filho B, *et al.* Antimicrobial and cytotoxic activities of medicinal plants of the Brazilian cerrado, using Brazilian cachaça as extractor liquid. *J Ethnopharmacol* 2011;113:420-5.
- Shoemaker M, Cohen I, Campbell M. Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells. *J Ethnopharmacol* 2004;93:381-4.
- Andrade D, Gil C, Breitenfeld L, Domingues F, Duarte AP. Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Ind Crops Prod* 2009;30:165-7.
- Ravikumar Y, Mahadevan K, Kumaraswamy M, Vaidya V, Manjunatha H, Kumar, V, *et al.* Antioxidant, cytotoxic and genotoxic evaluation of alcoholic extract, of *Polyanthia cerasoides* (Roxb.) Bedd. *Environ Toxicol Pharm* 2008;26:142-6.

Cite this article as: Luis Á, Breitenfeld L, Ferreira S, Duarte AP, Domingues F. Antimicrobial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Hakea sericea* Schrader extracts. *Phcog Mag* 2014;10:S6-13.

Source of Support: Nil, **Conflict of Interest:** None declared.

2.4. Um novo derivado da família dos alquenilresorcinóis com propriedades anti-microbianas, isolado a partir dos frutos de *Hakea sericea*

Artigo 4

An Alkenylresorcinol Derivative from *Hakea sericea* Fruits and their Antimicrobial Activity

Ângelo Luís, Carla Cruz, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues

Natural Product Communications, Vol. 8, No. 10, 1459 - 1462, 2013

An Alkenylresorcinol Derivative from *Hakea sericea* Fruits and their Antimicrobial Activity

Ângelo Luís, Carla Cruz, Ana Paula Duarte and Fernanda Domingues*

CICS-UBI – Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Av. Infante D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal

fdomingues@ubi.pt

Received: July 11th, 2013; Accepted: August 14th, 2013

Hakea sericea has been introduced to Portugal for ornamental purposes. The phytochemical composition and the antioxidant, antibacterial, antibiofilm and cytotoxic properties of this shrub species have been previously reported. The present work describes the bioassay-guided fractionation of the crude methanolic extract of *H. sericea* fruits and the isolation of 9-(3,5-dihydroxy-4-methylphenyl)nona-3(Z)-enoic acid. The structure of this new compound was established by one- and two-dimensional NMR and IR spectroscopy, and high-resolution mass spectrometry. The antibacterial properties of the new alkenylresorcinol were studied by determining its MIC values against several strains of Gram-positive and Gram-negative bacteria using the resazurin microtiter assay. The new alkenylresorcinol inhibited the growth of *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* with MIC values of 0.31, 0.02 and 0.16 mg/mL, respectively. Good MIC values were obtained against *Staphylococcus aureus* strains (0.005 – 0.16 mg/mL), including the clinical isolates (SA 01/10, SA 02/10 and SA 03/10) and MRSA strains.

Keywords: *Hakea sericea* Schrader, Bioassay-guided fractionation, Antibacterial activity, 9-(3,5-Dihydroxy-4-methylphenyl)nona-3(Z)-enoic acid.

Hakea is a genus of shrubs and small trees native to South Australia. Some taxa are disseminating very fast and have become invasive species through both non-protected and protected areas of New Zealand, South Africa and the Mediterranean basin. In Portugal, *H. sericea* Schrader (family Proteaceae) has been introduced for ornamental purposes and the formation of hedgerows, especially near the coastline [1]. A key characteristic of *H. sericea* is its extreme serotinous habit; all of its seeds are retained in pairs in tough woody follicles, which accumulate along the branches throughout the life of the plant [2].

In a previous report *H. sericea* methanolic extracts were studied [3]. These demonstrated very good antioxidant properties, namely radical scavenging activity of DPPH free radicals and the inhibition of linoleic acid oxidation, which is an indicator of inhibition of lipid peroxidation [3]. These antioxidant properties could be associated with the presence of phenolics, tannins and flavonoids. It was also found that *H. sericea* possesses high concentrations of some secondary metabolites, namely alkaloids [3].

Other researchers have studied *Hakea* spp. extracts and their promising antimicrobial properties against *Staphylococcus aureus* strains [1]. In a previous study focused on characterizing this shrub, the crude methanolic extract of *H. sericea* fruits exhibited pronounced antimicrobial activity, namely against *S. aureus*, including some methicillin resistant strains, together with inhibition of biofilm formation [4]. Moreover, it was also found that the fruit extract presented no toxicity towards NHDF cells, whereas for MCF-7 cells, this extract was able to decrease mitochondrial dehydrogenases activity by about 60% in the MTT test, indicating a relevant cytotoxicity towards these cancer cells and potential anti-carcinogenic properties [4].

In the present study, the methanolic extract of *H. sericea* fruits exhibited pronounced antimicrobial activity against *S. aureus*, including some methicillin resistant strains (Table 1). Based on such results it was decided to fractionate the extract to identify the

compounds responsible for such biological activity. The crude methanolic extract was successively eluted with solvents of increasing polarity using silica gel column chromatography. The fractions were analyzed by TLC, which revealed the presence of phenolics (Folin-Ciocalteu's reagent), flavonoids (aluminum chloride), and antioxidant substances (DPPH).

Direct bioautography was used to evaluate the potential antimicrobial activity of the fractions. The developed chromatoplates were dipped into a cell suspension, and after incubation, it was possible to visualize the inhibition zones by using a vital dye. The evaluation of the activity was performed directly on the adsorbent layer [5]. Some fractions demonstrated good antimicrobial properties, especially for *S. aureus* strains, where cream-white inhibition zones were observed indicating the inhibition of growth. It was then possible to decide which fractions could be pooled and which ones had some biological activity; nine sub-fractions were obtained. The minimum inhibitory concentration (MIC) of each one of them against three strains of *S. aureus* was determined using the resazurin microtiter assay (Table 1).

Table 1: MIC values (mg/mL) of methanolic crude extract of *H. sericea* fruits and its sub-fractions (modal values).

Strain	Crude extract	Sub-fractions								
		A	B	C	D	E	F	G	H	I
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	0.31	0.31	0.02	0.02	0.005	5	0.005	5	>10	0.005
MRSA 10/08	0.31	0.31	0.08	0.02	0.08	10	0.02	5	>10	0.02
MRSA 12/08	0.31	1.25	0.08	0.02	0.08	10	0.02	5	>10	0.02

Resazurin, a blue colored redox dye, allows the detection of microbial growth in extremely small volumes of solution in microtiter plates without the use of a spectrophotometer [6]. This assay is based on the ability of viable and metabolically active cells to reduce resazurin to resorufin and finally colorless dihydroresorufin [7]. The MIC value for some sub-fractions was

slightly lower than that of the crude extract. Specifically, sub-fractions C, D, F and I had the lowest MICs for *S. aureus* strains, indicating a potential antimicrobial activity.

From Table 1, fractions D, F and I showed the best antibacterial activity and, in addition, were the purest ones (only one spot on TLC with some residual impurities). For that reason, these fractions were then analyzed by NMR and IR spectroscopy, and HRMS to elucidate the structure of the main compound responsible for the biological activity. It was possible to conclude that one major compound was present in all bioactive sub-fractions.

The compound was obtained as colorless oil. The IR spectrum displayed absorptions at 3550 - 3200 (broad, s) and at 1710 cm^{-1} , indicating the presence of hydroxyl and carbonyl groups, respectively. The HRMS of the compound exhibited a molecular ion at m/z 278.151, which corresponded to the molecular formula $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$. Analysis of the NMR spectra indicated that 9-(3,5-dihydroxy-4-methylphenyl)nona-3(*Z*)-enoic acid (Figure 1) is the main compound of all the sub-fractions collected from column chromatography, giving a single spot on TLC. The ^1H NMR spectrum showed a pair of aromatic meta protons at δ 6.16 (1 H-2, singlet) and δ 6.07 (1 H-6, singlet), one aromatic methyl group at δ 1.92 (3H, singlet), as well as vicinal protons belonging to olefinic methines at δ 5.37 and 5.35 (2H, br t, $J=9.5$ Hz) and six methylenes at δ 2.78 (2 H-8', m), 2.39 (2 H-1', t, $J=14.5$ Hz), 2.03 (2H-5', t, $J=11.9$ Hz), 1.51 (2H-2', m) and 1.28 (H-3', H-4', m).

The ^{13}C NMR together with DEPT90 and DEPT135 spectra indicated a total of 16 carbons including one carboxylic group at δ 180, four quaternary carbons (δ 159.8, 157.5, 145.7, 108.7), four -CH, two of which are from one double bond at δ 131.2 and 129.3, and the others are aromatic protons at δ 107.8 and 107.5. The ^{13}C DEPT135 also showed one -CH₃ at δ 9.92 and six -CH₂ from the alkyl chain at δ 36.9 (adjacent to the benzene), 32.5, 30.6, 30.4, 28.2, and 26.9.

The two-dimensional ^1H - ^1H COSY, ^1H - ^1H TOCSY, ^1H - ^{13}C HSQC and ^1H - ^{13}C HMBC experiments supported the proposed structure. The phase sensitive COSY revealed the coupling between the methylene protons of the alkyl chain, such as, H-9 and H-8; H-8 and H-6, H-7; H-6, H-7 and H-5; H-5 and H-4; H-2 and H-3, indicating that they are adjacent to each other. The carbons bonded directly to the different protons were identified from the HSQC spectrum (see Table 2). Furthermore, in TOCSY, long-range correlations were observed with H-3 and H-2, H-4, and H-4 and H-5, H-6, H-7, confirming the assignment of the olefinic methines.

In the HMBC spectrum, the C-5 hydroxyl (at δ 159.8) showed 3J correlation with H-6 at δ 6.07 and a quaternary carbon at δ 107.8. Other 3J connectivities were found for the quaternary C-3 hydroxyl (at δ 157.5) with the methyl protons at δ 1.92 and H-2 at δ 6.16. The alkyl protons H-9 (CH₂ at δ 2.39), in the HMBC spectrum, showed strong correlations with quaternary C-1 at δ 145.7, C-6 at δ 107.8 and C-2 at δ 107.5, confirming the assignment of aromatic meta protons (H-2 and H-6). A 2J correlation by alkyl protons H-2 (CH₂ at δ 2.78) was found with the carbon of the double bond C-3 at δ 131.2 and the carboxyl carbon at δ 180.1. The alkyl protons H-5 (CH₂ at δ 2.03) exhibited strong 2J correlation to C-6 and C-7 (δ 30.6 and 30.4, respectively) and to carbon C-4 of the double bond at δ 129.3 completing the assignments of all protons and carbons for this molecule (Table 2).

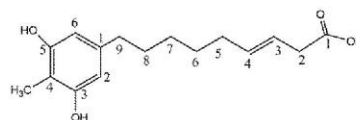


Figure 1: Structure of 9-(3,5-dihydroxy-4-methylphenyl)nona-3(*Z*)-enoic acid.

Table 2: ^1H and ^{13}C , DEPT90 and DEPT135 spectral data of 9-(3,5-dihydroxy-4-methylphenyl)nona-3(*Z*)-enoic acid in $\text{DMSO}-d_6$.

Position	^1H δ (ppm), multiplicity and <i>J</i>	^{13}C , DEPT90 and DEPT135 δ (ppm)
1	-	145.7 (C)
2	6.16 (1H, s)	107.5 (CH)
3	-	157.5 (C-OH)
4	1.92 (3H, s)	9.92 (CH ₃); 108.7 (C)
5	-	159.8 (C-OH)
6	6.07 (1H, s)	107.8 (CH)
9	2.39 (2H, t, $J=14.5$ Hz)	36.9 (CH ₂)
8	1.51 (2H, m)	32.5 (CH ₂)
6 and 7	1.28 (2H, m)	30.6 (CH ₂); 30.4 (CH ₂)
5	2.03 (2H, t, $J=11.9$ Hz)	28.2 (CH ₂)
4	5.37 (1H, br t, $J=9.5$ Hz)	131.2 (CH)
3	5.35 (1H, br t, $J=9.5$ Hz)	129.3 (CH)
2	2.78 (2 H, m)	26.9 (CH ₂)
1	-	180.1 (COO)

Previous studies with other *Hakea* species led to the isolation and identification of 5-alkylresorcinols that cleave DNA [8]. The chemical and biological properties of other resorcinols isolated from plants are well described, namely their cytotoxic [9,10], anticarcinogenic [11], antiproliferative [12], antileishmanial [13] and antioxidant properties [14].

The antimicrobial activity of the new resorcinol was tested against several strains of Gram-negative and Gram-positive bacteria, using the resazurin microtiter assay (Table 3). Very good antibacterial properties were demonstrated against the Gram-positive strains, with inhibition of the growth of *E. faecalis*, *L. monocytogenes* and *B. cereus* with MIC values of 0.31, 0.02 and 0.16 mg/mL, respectively. Good MIC values (0.005 - 0.16 mg/mL) were obtained for *S. aureus*, including the clinical isolates SA 01/10, SA 02/10 and SA 03/10, and MRSA strains. This is consistent with the phenolic nature of the compound.

Table 3: MIC values (mg/mL) of 9-(3,5-dihydroxy-4-methylphenyl)nona-3(*Z*)-enoic acid) (modal values).

Strain	MIC (mg/mL)
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 13311	> 5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	> 5
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	> 5
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 13883	> 5
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	0.31
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 11778	0.02
<i>Listeria monocytogenes</i> LMG 16779	0.16
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	0.005
MRSA 10/08	0.02
MRSA 12/08	0.02
<i>S. aureus</i> SA 01/10	0.16
<i>S. aureus</i> SA 02/10	0.16
<i>S. aureus</i> SA 03/10	> 5

By comparing the MIC results for the new compound against *S. aureus* strains with those obtained for the sub-fractions D, F and I of *H. sericea* fruits, it is possible to verify that the values are very similar (Tables 1 and 3), indicating that the antimicrobial activity of the extracts is probably due to the new alkenylresorcinol derivative. However, the new resorcinol was not inhibitory to Gram-negative strains of bacteria, probably due to its large chemical structure, which prevents its entry into those bacteria. It is not known exactly why Gram-negative bacteria should be less susceptible, but it may be related to the outer membrane of Gram-negative bacteria, which ends the bacterial surface with strong hydrophilicity and acts as a strong permeability barrier [15].

In conclusion, in this work a new alkenylresorcinol derivative, 9-(3,5-dihydroxy-4-methylphenyl)nona-3(Z)-enoic acid, was isolated and characterized from the methanolic extract of *H. sericea* fruits. This compound demonstrated very good activity against Gram-positive bacteria. It was possible to conclude that the antimicrobial activity of this shrub is probably due to the new alkenylresorcinol derivative.

Experimental

Plant material: Fruits of *H. sericea* were collected in Serra da Estrela (GPS coordinates: N 40°20.296'; W 07°27.491'; Altitude: 730 m). Plant materials were dried at 35°C in a ventilated oven for 48 h and reduced to a coarse powder (< 2 mm) using a laboratory cutting mill. Harvesting, transport and storage of this plant species were authorized by the Portuguese Institute for Nature Conservation and Biodiversity (ICNB). The species was identified by a botanist and a voucher specimen (No. LISI 13/2011) has been deposited in the Herbarium of the Instituto Superior de Agronomia (Jardim Botânico d'Ajuda, Lisboa).

General: IR, Thermo Scientific Nicolet iS10 ATR-FTIR spectrophotometer; HRMS, microTOF(focus) mass spectrometer (Bruker Daltonics, Bremen, Germany); 1D and 2D NMR, Bruker Avance III 600 MHz spectrometer.

Extraction procedure: The methanolic extract of *H. sericea* fruits was obtained with a Soxhlet apparatus until the solvent became colorless, using approximately 100 g of raw material and 1000 mL of solvent. The extract solutions were filtered under vacuum using a crucible of porosity #2 and then distilled under reduced pressure until a final volume of 100 mL. Prior to use, the extracts were dried using a rotary evaporator under reduced pressure, and then dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO).

Bioassay-guided fractionation and isolation: Based on the results of exploratory TLC, the methanolic crude extract of *H. sericea* fruits was fractionated by CC using silica-gel 60 (0.06-0.2 mm; 70-230 mesh) packed in light petroleum/diethyl ether (7:3). Elution was performed stepwise with solvents of increasing polarity, starting with light petroleum containing increasing amounts of diethyl ether and then eluted sequentially with chloroform, ethyl acetate, methanol and water. Fractions of 10 mL were recovered and the course of elution was monitored by TLC. Solvents were removed using a rotary evaporator at 45°C. The fractionation process was repeated 4 times to achieve greater amounts of each fraction. At the end, 25 fractions were obtained. The fractions were analyzed by TLC using precoated TLC plates (silica-gel 60 F₂₅₄ aluminum sheets) eluted with two different polarity mixtures of solvents, as mobile phase: chloroform/ethyl acetate (1:1) and ethyl acetate/methanol (1:1). Fractions were dissolved in methanol and aliquots were applied to TLC plates. After elution, plates were visualized under visible and ultra-violet light (254 and 365 nm). Folin-Ciocalteu's reagent (0.2 N) was also used to identify phenolics; aluminum chloride (10%) for flavonoids; and methanolic solution of DPPH (40 µg/mL) for antioxidant activity. Quercetin, gallic, caffeic and chlorogenic acids (5 mg/mL) were used as positive controls. The fractions with the same R_f value for the major spot were pooled together and thus the number of fractions was reduced from 25 to 5. These were sub-fractionated under the same conditions in order to obtain the purest fractions possible. Finally, 9 sub-fractions (A: 278.0 mg; B: 173.8 mg; C: 135.2 mg; D: 80.0 mg; E: 48.5 mg; F: 52.4 mg; G: 32.3 mg; H: 3.5 g; I: 499.4 mg) of the initial methanolic crude extract of *H. sericea* fruits were obtained and used to evaluate potential antimicrobial activity.

9-(3,5-dihydroxy-4-methylphenyl)nona-3(Z)-enoic acid

Colorless oil

IR: Absorptions at 3550 - 3200 (broad, s) and at 1710 cm⁻¹.

¹H and ¹³C NMR: Table 2.

MS: *m/z* 278.151, corresponding to the molecular formula C₁₆H₂₂O₄.

Antimicrobial activity

Test microorganisms and culture media: The antimicrobial studies were carried out against 13 bacterial strains (Gram-positive: *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Listeria monocytogenes* LMG 16779, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, clinical isolates of *S. aureus* SA 01/10, SA 02/10, SA 03/10 and methicillin-resistant *S. aureus* MRSA 10/08 and MRSA 12/08; Gram-negative: *Salmonella typhimurium* ATCC 13311, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922 and *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883). Stock cultures were prepared and stored with 20% glycerol at -80°C. The strains were sub-cultured on an appropriate agar plate 24 h prior to any antimicrobial test and when cultured from stock, they were sub-cultured before use. Brain Heart Infusion Agar (BHI) was used for the growth of bacterial species.

Bioautography: After elution, the TLC plates were subjected to direct bioautography [16]. The TLC plates spotted with sub-fractions were manually immersed (for about 10 s) in the bacterial suspensions. The inoculum was prepared by diluting 1:10 in Müller-Hinton broth (MHB) the direct bacterial suspension in saline solution of 0.5 McFarland (about 1-2×10⁸ CFU/mL to non-fastidious bacteria). Then, TLC plates were placed in a moistened plastic box lined with wetted paper and incubated at 37°C for 18 h. After incubation, they were sprayed with 0.2% MTT aqueous solution and incubated again at 37°C for 30 min. One drop of TritonX-100/10 mL aqueous MTT was found to enhance the intensity of the color. In places with antimicrobial compounds, cream-white inhibition zones were observed [17].

Resazurin microtiter assay: The antimicrobial activity of crude extract, sub-fractions and new compound was assessed using resazurin microtiter assay. Plates were prepared under aseptic conditions. A sterile 96 well plate was labeled. A volume of 100 µL of sub-fractions in 10% v/v, DMSO (stock concentration of 20 mg/mL in MHB) was pipetted into the first row of the plate. To all other wells 50 µL of MHB was added. Serial dilutions were performed using a multichannel pipette. Tips were discarded after use such that each well had 50 µL of the test material in serially descending concentrations. To each well, 10 µL of resazurin indicator solution (0.1 % diluted in MHB) was added. Using a pipette, 30 µL of fresh MHB was added to each well. Finally, 10 µL of bacterial suspension (0.5 McFarland) was added to the wells. Each plate was wrapped loosely with cling film to ensure that bacteria did not become dehydrated. Each plate had a set of controls: a column with a broad-spectrum antibiotic as a positive control, a column with all solutions with the exception of the test compounds, and a column with all solutions with the exception of the bacterial suspension, adding the respective volume of MHB instead. The plates were prepared in triplicate, and placed in an incubator set at 37°C for 18 h. The color change was then assessed visually. Any color changes from purple to pink or colorless were recorded as positive. The lowest concentration at which change occurred was taken as the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) value [6].

Acknowledgments - Ângelo Luis acknowledges a PhD fellowship from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Reference: SFRH/BD/65238/2009), co-funded by Fundo Social Europeu (POPH-QREN) and by national funds of Ministério da Educação e Ciência. Carla Cruz acknowledges the post-doctoral grant from FCT (SFRH/BPD/46934/2008). Authors wish to thank Prof.^a Dr.^a Dalila Espirito-Santo and Dr.^a Paula Paes, from the Herbarium of the Instituto Superior de Agronomia (Jardim Botânico d'Ajuda,

Lisboa), for the identification and deposit of the voucher specimens of the plant species used in this work. The NMR spectrometers are localized at the Health Sciences Research Centre (University of Beira Interior) and were purchased by the project POVT-0439-FEDER-00001. This work was partially supported by the project PEst-C/SAU/UI0709/2011 funded by Fundação para a Ciência e a Tecnologia through the program COMPETE.

References

- [1] Madureira AM, Duarte A, Teixeira G. (2012) Antimicrobial activity of selected extracts from *Hakea salicifolia* and *H. sericeae* (Proteaceae) against *Staphylococcus aureus* multiresistant strains. *South African Journal of Botany*, **81**, 40–43.
- [2] Le Maitre DC, Krug RM, Hoffmann JH, Gordon AJ, Mgidi TN. (2008) *Hakea sericea*: Development of a model of the impacts of biological control on population dynamics and rates of spread of an invasive species. *Ecological Modelling*, **212**, 342–358.
- [3] Luis A, Duarte AP, Domingues F. (2011) Bioactive compounds, RP-HPLC analysis of phenolics, and antioxidant activity of some Portuguese shrub species extracts. *Natural Product Communications*, **6**, 1863–1872.
- [4] Luis A, Breitenfeld L, Ferreira S, Duarte AP, Domingues F. (2013) Antimicrobial, antibiofilm and cytotoxic activities of *Hakea sericea* Schrader extracts. *Pharmacognosy Magazine*, In Press.
- [5] Móczis AM, Szarka S, Ott PG, Héthelyi EB, Szoke E, Tyihák E. (2012) Separation and identification of antibacterial chamomile components using OPLC, bioautography and GC-MS. *Medicinal Chemistry*, **8**, 85–94.
- [6] Sarker SD, Nahar L, Kumarasamy Y. (2007) Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, **42**, 321–324.
- [7] Karuppusamy S, Rajasekaran KM. (2009) High throughput antibacterial screening of plant extracts by resazurin redox with special reference to medicinal plants of Western Ghats. *Global Journal of Pharmacology*, **3**, 63–68.
- [8] Barr J, Murty V, Yamaguchi K, Singh S, Smith D, Hecht S. (1988) 5-Alkylresorcinols from *Hakea amplexicaulis* that cleave DNA. *Chemical Research in Toxicology*, **1**, 204–207.
- [9] Chaturvedula VSP, Schilling JK, Miller JS, Andriantsiferana R, Rasamison VE, Kingston DGI. (2002) New cytotoxic bis 5-alkylresorcinol derivatives from the leaves of *Oncostemon bojerianum* from the Madagascar rainforest. *Journal of Natural Products*, **65**, 1627–1632.
- [10] Chuang TH, Wu PL. (2007) Cytotoxic 5-alkylresorcinol metabolites from the leaves of *Grevillea robusta*. *Journal of Natural Products*, **70**, 319–323.
- [11] Sánchez L, Olmedo D, López-Pérez J, Williams T, Gupta M. (2012) Two new alkylresorcinols from *Homalonema wedlandii* and their cytotoxic activity. *Natural Product Communications*, **7**, 1043–1046.
- [12] Starks CM, Williams RB, Norman VL, Lawrence JA, O'Neil-Johnson M, Eldridge GR. (2012) Phenylpropanoids from *Phragmipedium calurum* and their antiproliferative activity. *Phytochemistry*, **82**, 172–175.
- [13] Jime C, Torres-Mendoza D, Uren LD, Ortega-Barri E, Mcphail KL, Gerwick WH, Cubilla-Rios L. (2007) Hydroxyalkenylresorcinols from *Stylogyne turbacensis*. *Journal of Natural Products*, **70**, 1249–1252.
- [14] López P, Ferraro G, Anesini C. (2011) Comparative antioxidant activity of an extract of *Lithraea molleoides* and an isolated 5-alkyl resorcinol derivative. Effects on the proliferation of normal and tumoral lymphocytes. *Phytotherapy Research*, **25**, 271–276.
- [15] Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. (1998) Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Letters in Applied Microbiology*, **26**, 118–122.
- [16] Choma IM, Grzelak EM. (2011) Bioautography detection in thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography A*, **1218**, 2684–2691.
- [17] Grzelak EM, Majer-Dziedzic B, Choma IM. (2011) Development of a novel direct bioautography–thin-layer chromatography test: Optimization of growth conditions for Gram-negative bacteria, *Escherichia coli*. *Journal of AOAC International*, **94**, 1567–1572.

2.5. Isolamento, identificação e determinação da atividade antimicrobiana do ácido 9-(3,5-dihidroxi-4-metilfenil)nona-3(Z)-enóico

Patente

An Alkenylresorcinol Derivative from *Hakea sericea* Fruits and their Antimicrobial Activity

Ângelo Luís, Carla Cruz, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues

Pedido Provisório de Patente N.º 107033 (PT)

inpi instituto nacional
da propriedade industrial

UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR - MUSEU
DE LANIFÍCIOS
CONVENTO DE SANTO ANTÓNIO COVILHÃ
6200-001 COVILHÃ

Direção de Marcas e Patentes
Departamento de Patentes e Modelos de Utilidade

Ref. DP/01/2013/26651	PATENTE DE INVENÇÃO NACIONAL n.º 107033	Data: 2013.08.23
-----------------------	--	------------------

OFÍCIO

Junto se envia a o relatório de pesquisa relativo ao pedido provisório n.º 107033, recebido a 2013.07.01.

Este relatório destina-se a permitir uma primeira avaliação da matéria técnica contida no pedido provisório submetido bem como a respetiva comparação com o estado da técnica divulgado à data do pedido. Este relatório não possui um carácter vinculativo já que a aferição da possível patenteabilidade só poderá ser feita aquando da análise do pedido definitivo em sede de exame da invenção.

Mais se informa que, nos termos n.º 1 do artigo 62.º-B do Código da Propriedade Industrial, para que o presente pedido tenha continuidade, o mesmo deverá ser convertido em pedido definitivo antes de expirado o prazo de 12 meses a contar da data da sua apresentação, acompanhado dos elementos previstos nos artigos 61.º e 62.º devidamente redigidos em Língua Portuguesa. Caso não seja efetuada a conversão, o pedido será considerado retirado, nos termos do n.º 6 do citado artigo.

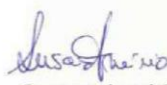
M0629 02

Campo das Cebolas - 1349-036 Lisboa - Portugal
www.marcaspatentes.pt e-mail: ari@inpi.pt
tel: +351 21 881 81 00 - fax: +351 21 886 98 59
linha azul 808 230 689

inpi instituto nacional
da propriedade industrial

Informa-se ainda que a referida conversão poderá ser efetuada eletronicamente, através dos serviços do Portal www.inpi.pt (sendo necessária a utilização de certificado digital) ou através da apresentação, presencial ou via postal, do formulário PatMut-3 e do respetivo meio de pagamento, no valor de 72,97€ (se o ato for praticado por via eletrónica) ou de 145,93€ (se o ato for praticado via presencial/postal). Caso a apresentação seja feita por via postal, o formulário deverá ser acompanhado de cheque ou vale postal emitido a favor do Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

Com os melhores cumprimentos,


Susana Armário
Técnica Superior

M0629.02

Campo das Cebolas - 1149-035 Lisboa - Portugal
www.marcaspatentes.pt e-mail atm@inpi.pt
tel. +351 21 882 91 00 - fax +351 21 886 98 69
linha azul 808 200 689

Direção de Marcas e Patentes
Departamento de Patentes e Modelos de Utilidade

**RELATÓRIO DE PESQUISA
DO PEDIDO PROVISÓRIO DE PATENTE N.º 107033**

Pedido nº 107033		Data de prioridade: 2013/07/01
Requerente: UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR - MUSEU DE LANIFÍCIOS		
Data da pesquisa: 2013/08/21 a 23 Bases de Dados Pesquisadas: WPI, EPODOC, XPESP, XPESP2, EMBASE, MEDLINE, NPL, PUBCOMP, PUBSUBS, GOOGLE, PUBCHEM, CHEMSPIDER, ESPACENET, SI-INPI		
Categoria ^{(1) (2)}	Identificação do documento e da passagem relevante	Reivindicações relacionadas ⁽¹⁾
---	Madureira A.M., <i>et. al.</i> , " Antimicrobial activity of selected extracts from <i>Hakea salicifolia</i> and <i>H. sericeae</i> (Proteaceae) against <i>Staphylococcus aureus</i> multiresistant strains " SOUTH AFRICAN JOURNAL OF BOTANY Vol. 81, pp 40 – 43, 2012-05-21 Todo o documento.	---
---	Wang H., <i>et. al.</i> , " Prenylated bisresorcinols from <i>Grevillea floribunda</i> " PHYTOCHEMISTRY LETTERS, ELSEVIER Vol. 2, nº 1, pp 41 – 45, 2009-02-19 Todo o documento.	---
⁽¹⁾ Campos a preencher no caso do pedido provisório de patente conter reivindicações		
A	Documento que define o estado da técnica em geral e que não se considera ser de particular relevância;	*T*
E	Pedido de patente anterior mas que é publicado na mesma data ou em data posterior à do pedido;	*X*
L	Documento que pode lançar dúvidas sobre a reivindicação de prioridade, ou que é citado para estabelecer a data de publicação de outra citação ou qualquer outra razão (como especificado);	*Y*
O	Documento que se refere a uma divulgação oral, uso, exibição ou qualquer outro meio;	*Z*
P	Documento publicado antes da data de pedido mas depois da data de prioridade.	*G*
		Documento publicado depois da data de pedido ou prioridade e que não está em conflito com o pedido mas que é citado para compreender o princípio ou teoria subjacente à invenção;
		Documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova ou pode não implicar atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente;
		Documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada como tendo implicado atividade inventiva quando o documento é combinado com um ou mais deste tipo de documentos, dado que a combinação é evidente para um perito na especialidade;
		Documento membro da mesma família de documentos de patente;

M0629.02

Campo das Cebolas - 1149-035 Lisboa - Portugal
www.marcaspatentes.pt e-mail: atm@inpi.pt
tel. +351 21 880 81 00 - fax +351 21 886 98 69
linha azul 808 200 689

Categoria ⁽¹⁾ ⁽²⁾	Identificação do documento e da passagem relevante	Reivindicações relacionadas ⁽¹⁾
---	<p>Jiménez-Romero C., <i>et. al.</i>, "Hydroxyalkenylresorcinols from Stylogyne turbacensis" Journal of natural products Vol. 70, nº 8, pp 1249 – 1252, 2007-07-13</p> <p>Todo o documento.</p>	---
---	<p>Lopez P., <i>et. al.</i>, "Comparative Antioxidant Activity of an Extract of Lithraea molleoides and an Isolated 5-alkyl Resorcinol Derivative. Effects on the Proliferation of Normal and Tumoral Lymphocytes" PHYTOTHERAPY RESEARCH Vol. 25, nº 2, pp 271 – 276, 2011-02</p> <p>Todo o documento.</p>	---
---	<p>Sanchez L.A., <i>et. al.</i>, "Two new alkylresorcinols from Homalomena wendlandii and their cytotoxic activity" NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS Vol. 7, nº 8, pp 1043 – 1046, 2012</p> <p>Resumo.</p>	---
---	<p>Chuang T.H., <i>et. al.</i>, "Cytotoxic 5-alkylresorcinol metabolites from the leaves of Grevillea robusta" JOURNAL OF NATURAL PRODUCTS Vol. 70, nº 2, pp 319 – 323, 2007-02</p> <p>Todo o documento.</p>	---
---	<p>Angelo L., <i>et. al.</i>, "Bioactive compounds, RP-HPLC analysis of phenolics, and antioxidant activity of some Portuguese shrub species extracts" NATURAL PRODUCT COMMUNICATIONS Vol. 6, nº 12, pp 1863 – 1872, 2011-12</p> <p>Resumo.</p>	---

⁽¹⁾ Campos a preencher no caso do pedido provisório de patente conter reivindicações.

A	Documento que define o estado da técnica em geral e que não se considera ser de particular relevância;	*T*	Documento publicado depois da data de pedido ou prioridade e que não está em conflito com o pedido mas que é citado para compreender o princípio ou teoria subjacente à invenção;
E	Pedido de patente anterior mas que é publicado na mesma data ou em data posterior à do pedido;	*X*	Documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada nova ou pode não implicar atividade inventiva quando o documento é considerado isoladamente;
L	Documento que pode lançar dúvidas sobre a reivindicação de prioridade, ou que é citado para estabelecer a data de publicação de outra citação ou qualquer outra razão (como especificado);	*Y*	Documento de particular relevância; a invenção reivindicada não pode ser considerada como tendo implicado atividade inventiva quando o documento é combinado com um ou mais deste tipo de documentos, dado que a combinação é evidente para um perito na especialidade;
O	Documento que se refere a uma divulgação oral, uso, exibição ou qualquer outro meio;	*&*	Documento membro da mesma família de documentos de patente;
P	Documento publicado antes da data de pedido mas depois da data de prioridade.		

M0629 02

Campo das Cebolas - 1149-035 Lisboa - Portugal
www.marcaeapatenas.pt - e-mail: atm@inpi.pt
tel: +351 21 880 81 00 - fax: +351 21 886 98 99
linha azul: 808 200 689

Categoria ⁽¹⁾ (2)	Identificação do documento e da passagem relevante	Reivindicações relacionadas ⁽¹⁾
---	<p>Barr J.R., <i>et. al.</i>, "5-Alkylresorcinols from hakea-amplexicaulis that cleave DNA" CHEMICAL RESEARCH IN TOXICOLOGY Vol. 1, nº 4, pp 204 – 207, 1988</p> <p>Todo o documento.</p>	---
---	<p>Nabil A.A.M., <i>et. al.</i>, "Alkenylresorcinols and cytotoxic activity of the constituents isolated from Labisia pumila" PHYTOCHEMISTRY, PERGAMON PRESS Vol. 80, pp 42 – 49, 2012-04-18</p> <p>Todo o documento.</p>	---
---	<p>Yamashita Y., <i>et. al.</i>, "Grevillosides A-F: Glucosides of 5-alkylresorcinol derivatives from leaves of Grevillea robusta" PHYTOCHEMISTRY Vol. 69, nº 15, pp 2749 – 2752, 2008-11-01</p> <p>Todo o documento.</p>	---
⁽¹⁾ Campos a preencher no caso do pedido provisório de patente conter reivindicações		
A	Documento que define o estado da técnica em geral e que não se considera ser de particular relevância.	*T*
E	Pedido de patente anterior mas que é publicado na mesma data ou em data posterior à do pedido;	*X*
L	Documento que pode lançar dúvidas sobre a reivindicação de prioridade, ou que é citado para estabelecer a data de publicação de outra citação ou qualquer outra razão (como especificado);	*Y*
O	Documento que se refere a uma divulgação oral, uso, exibição ou qualquer outro meio;	*Z*
P	Documento publicado antes da data de pedido mas depois da data de prioridade.	*&*

COMENTÁRIOS DO EXAMINADOR

Identificação da Invenção

O documento apresentado, nos termos da alínea e) do nº 2 do artigo 62º-A do Código da Propriedade Industrial (CPI), com o Pedido Provisório de Patente (PPP) em estudo contém matéria técnica pesquisável. Como tal, foi efetuada a pesquisa ao estado da técnica disposta no nº 4 do mesmo artigo.

A referida pesquisa foi feita com base nas características técnicas identificadas e percecionadas como relevantes nos elementos apresentados pelo requerente. É prematura, neste momento, uma opinião pormenorizada quanto aos requisitos de patenteabilidade. Assim, os comentários seguintes refletem, globalmente, a relevância dos documentos do estado da técnica para as referidas características técnicas.

Pesquisa ao Estado da Técnica (artigo 56º do CPI)

A pesquisa efetuada ao estado da técnica, referente ao presente PPP, incidiu sobre as seguintes características técnicas: ácido 9-(3,5-dihidroxi-4-metilfenil)nona-3(z)-enóico; derivados de alquilresorcinol obtidos por extração a partir de frutos de *Hakea sericea* Schrader; atividade antimicrobiana do composto.

Os documentos encontrados na pesquisa ao Pedido Provisório de Patente, efetuada nos termos do nº 4 do artigo 62º-A do CPI, tidos como os mais relevantes, passarão doravante a ser referidos como:

- D1. *Antimicrobial activity of selected extracts from Hakea salicifolia and H. sericeae (Proteaceae) against Staphylococcus aureus multiresistant strains*
- D2. *Prenylated bisresorcinols from Grevillea floribunda*
- D3. *Hydroxyalkenylresorcinols from Stylogyne turbacensis*
- D4. *Comparative Antioxidant Activity of an Extract of Lithraea molleoides and an isolated 5-alkyl Resorcinol Derivative. Effects on the Proliferation of Normal and Tumoral Lymphocytes*

- D5. *Two new alkylresorcinols from Homalomena wendlandii and their cytotoxic activity*
- D6. *Cytotoxic 5-alkylresorcinol metabolites from the leaves of Grevillea robusta*
- D7. *Bioactive compounds, RP-HPLC analysis of phenolics, and antioxidant activity of some Portuguese shrub species extracts*
- D8. *5-Alkylresorcinols from Hakea amplexicaulis that cleave DNA*
- D9. *Alkenylresorcinols and cytotoxic activity of the constituents isolated from Labisia pumila*
- D10. *Grevillosides A-F: Glucosides of 5-alkylresorcinol derivatives from leaves of Grevillea robusta*

Os documentos acima referidos antecipam o facto de derivados de alquilresorcinol ou de resorcinol possuírem atividades antimicrobianas e anticancerígenas. Estes documentos também antecipam que os referidos compostos podem ser extraídos de diversas plantas, incluindo as plantas do género *Hakea* e, em especial, da espécie *Hakea sericea*. Verifica-se, assim, que todos os documentos acima citados diferem da invenção em estudo por não mencionarem, especificamente, o composto derivado de alquilresorcinol que constitui a invenção, i.e., o ácido 9-(3,5-dihidroxi-4-metilfenil)nona-3(z)-enóico.

De notar que a comparação da invenção face ao conteúdo dos documentos D5 e D7 foi incompleta visto que, à data da realização do presente relatório, a examinadora ainda não tinha acesso ao conteúdo completo destes documentos, pelo que só foi analisado o conteúdo do resumo dos mesmos.

Conclusão

Em conclusão, considera-se que os documentos acima citados não parecem comprometer o potencial de patenteabilidade da invenção, considerando o facto de que nenhum dos documentos acima identificados antecipa o ácido 9-(3,5-dihidroxi-4-metilfenil)nona-3(z)-enóico.

Observações finais

Informa-se ainda que a presente pesquisa e respetivos comentários, não possuem carácter vinculativo, podendo ser alterados em sede de exame da invenção, caso a conversão do pedido venha a ser realizada.

Recorda-se também que no âmbito do estabelecido pelo nº 2 do artigo 62º-B do CPI, quando as reivindicações do pedido definitivo não tenham base nos elementos incluídos na apresentação do pedido provisório, a prioridade do pedido no que respeita às referidas reivindicações conta-se da data da apresentação da matéria técnica que lhes serve de base.

Caso entenda complementar a matéria apresentada no pedido em causa, sugere-se que apresente novo PPP com a totalidade da matéria técnica que entender relevante, devidamente enquadrada no mesmo conceito inventivo. Este cenário é preferível em relação a outro que consista em adição de matéria técnica ao mesmo PPP, caso venha a optar por uma internacionalização do pedido de proteção para a invenção. Assim, evitar-se-á que autoridades de patentes estrangeiras possam considerar inválidas as datas de prioridade das matérias técnicas, quando aditadas no âmbito de um único PPP.

Caso opte por não proceder à conversão em pedido definitivo informa-se que o pedido é considerado retirado de acordo com o nº 6 do artigo 62º-B do CPI, não sendo considerado para efeitos do estado da técnica, uma vez que não é sujeito a publicação no Boletim da Propriedade Industrial. Lembra-se, neste contexto, que caso a matéria contida no PPP seja alvo de publicação à qual o INPI é alheio, a referida matéria fará parte do estado da técnica.

Instituto Nacional da Propriedade Industrial, 2013.08.23

Susana Armário
Técnica Superior

M0629.02

Campo das Cebolas - 1149-035 Lisboa - Portugal
www.marcaspatentes.pt - e-mail: atm@inpi.pt
tel: +351 21 881 81 00 - fax: +351 21 886 98 59
linha azul: 808 200 689

inpi instituto nacional
da propriedade industrial

Ex.mo Sr.

UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR - MUSEU
DE LANIFÍCIOS
CONVENTO DE SANTO ANTÓNIO
COVILHÃ
6200-001 COVILHÃ

Direção de Marcas e Patentes
Departamento de Patentes e Modelos de Utilidade

Ref ^o DMP/DGD/01/2014/435160	PATENTE DE INVENÇÃO NACIONAL n.º 107033	Data: 2014/01/07
---	---	------------------

OFÍCIO

Nos termos do nº 7 do artigo 62º-B do Código da Propriedade Industrial (CPI), informa-se que o prazo para conversão do pedido provisório de patente em pedido definitivo expira em 01/07/2014.

Assim, nos termos do nº 1 do mesmo artigo, deverá apresentar, antes do fim do prazo acima indicado, os seguintes elementos, devidamente redigidos em Língua Portuguesa:

- reivindicações do que é considerado novo e que caracteriza a invenção (atenção! quando as reivindicações não tenham base no documento apresentado aquando da submissão do pedido provisório, a prioridade do pedido definitivo conta-se da data das referidas reivindicações e não da data do pedido provisório, nos termos do nº 2 do referido artigo);
- descrição do objeto da invenção;
- desenhos necessários à perfeita compreensão da descrição;
- resumo da invenção.

A apresentação de todos estes elementos deverá respeitar os requisitos formais previstos nos artigos 61º e 62º do CPI e no Despacho Regulamentar do Presidente do Conselho Directivo do Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

Mais se informa que, nos termos do nº 6 do artigo 62º-B do CPI, a falta de apresentação atempada destes elementos conduz a que o pedido provisório seja considerado retirado.

Informa-se ainda que a referida conversão poderá ser efetuada eletronicamente, através dos serviços do Portal www.inpi.pt (sendo necessária a utilização de certificado digital) ou através da apresentação, presencial ou via postal, do Formulário PatMut.-3 e do respetivo meio de pagamento, no valor de 72,97 € (se o ato for praticado por via eletrónica) ou de 145,93 € (se o ato for praticado via presencial/postal). Caso a apresentação seja feita por via postal, o formulário deverá ser acompanhado de cheque ou vale postal emitido a favor do Instituto Nacional da Propriedade Industrial.

M0395.02

Campo das Cebolas - 1149-035 LISBOA - PORTUGAL
Telfs (351) 218 818 100 Linha Azul (351) 808 200 689
Fax (351) 218 883 720 Internet: www.inpi.pt

2.6. Atividade dos ácidos gálico, cafeico e clorogénico em células planctónicas e em biofilmes de *S. aureus*

Artigo 5

Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids

Ângelo Luís, Filomena Silva, Sónia Sousa, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues

Biofouling, Vol. 30, No. 1, 69 - 79, 2014

Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of gallic, caffeic, and chlorogenic acids

Ângelo Luís^a, Filomena Silva^a, Sónia Sousa^b, Ana Paula Duarte^a and Fernanda Domingues^{a*}

^aCICS-UBI – Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal; ^bPaper & Textile Materials Research Unit, University of Beira Interior, Covilhã, Portugal

(Received 16 July 2013; accepted 15 September 2013)

Staphylococcus aureus is a Gram-positive pathogen which is able to form biofilms, exhibiting a more pronounced resistance to antibiotics and disinfectants. The hurdles posed in eradicating biofilms have driven the search for new compounds able to fight these structures. Phenolic compounds constitute one of the most numerous and ubiquitous group of plant secondary metabolites with many biological activities. The aim of the present work was to study the potential antimicrobial and antibiofilm properties of gallic, caffeic, and chlorogenic acids against *S. aureus* as well to elucidate its mechanism of action. It was concluded that the phenolic acids studied in this work have antistaphylococcal properties. For instance, gallic acid is able to influence the adhesion properties of *S. aureus*. The phenolic acids tested were also able to inhibit the production of α -hemolysin by this microorganism, with the exception of chlorogenic acid. Regarding its mechanism of action, caffeic acid interferes with the stability of the cell membrane and with the metabolic activity of the cells of *S. aureus*.

Keywords: gallic acid; caffeic acid; chlorogenic acid; *S. aureus*; biofilms

Introduction

There is a natural tendency for microorganisms to attach to abiotic and biotic surfaces, to multiply and to embed themselves in a slimy matrix of extracellular polymeric substances (mainly proteins and polysaccharides), resulting in a biofilm (Sandasi et al. 2010; Borges et al. 2012). Biofilms are commonly associated with many health problems (eg periodontal disease, endocarditis, osteomyelitis, cystic fibrosis, and infections related to surgical implants) (Raja et al. 2011) contributing to >80% of all infections in humans. A particular characteristic of biofilms is their extreme resistance to antibiotics and disinfectants compared to their planktonic counterparts (Sandasi et al. 2010; Raja et al. 2011; Borges et al. 2012). Moreover, the emergence of antimicrobial-resistant bacteria clearly shows that new strategies for the control of biofilms are required (Borges et al. 2012).

Staphylococcus aureus is a Gram-positive pathogen which is able to form biofilms and to cause an array of diseases, ranging from minor localized skin lesions to life-threatening deep tissue damage and systemic infections, such as pneumonia, endocarditis, and exotoxin syndromes (Cotter et al. 2011; Qiu et al. 2011). Additionally, *S. aureus* is an important food-borne pathogen that causes staphylococcal gastroenteritis and food poisoning in humans. *S. aureus* has the potential to produce a large number of secreted and cell wall-related virulence factors, such as α -hemolysin and enterotoxins, that contribute to the diversity of *S. aureus*-associated

illnesses (Qiu et al. 2010, 2011). α -Hemolysin is a 33 kDa pore-forming protein that has cytolytic, hemolytic, and dermonecrotic activities. Many strains of *S. aureus* carry resistance genes for penicillin antibiotics, tetracyclines, methicillin, and more recently vancomycin. Methicillin-resistant *S. aureus* (MRSA) presents a significant threat to public health and is a major clinical concern (Quave et al. 2008).

Phenolic compounds or polyphenols, such as gallic, caffeic, and chlorogenic acids, constitute one of the most numerous and ubiquitous group of plant secondary metabolites (phytochemicals), which exhibit a wide range of biological effects. Gallic acid is commonly found in diverse tea leaves, oak bark, and grape seeds, while other vegetables, plants, coffee, and tea are good sources of caffeic and chlorogenic acids (Gonthier et al. 2006; Borges et al. 2012).

A model for the mode of action of phenolic phytochemicals was developed by other researchers (Kwon et al. 2007) based on the rationale that small phenolics in phytochemical profiles could behave as proline analogs or proline analog mimics and likely inhibit proline oxidation *via* proline dehydrogenase (Kwon et al. 2007). Moreover, these inhibitory effects of phenolic phytochemicals should be overcome by proline if the site of action is proline dehydrogenase (Kwon et al. 2007). Previous studies have provided clues in animal cell and bacteria model systems that phenolics could modulate a cellular redox response through a proline-linked pentose

*Corresponding author. Email: fdomingues@ubi.pt

phosphate pathway (Kwon et al. 2007). If proline dehydrogenase is inhibited by the phenolics, the energy metabolism of the bacterial cells is committed. Therefore, the rationale for the proline growth response assay was to evaluate whether small phenolics behave as proline analogs or proline mimics and, if so, could they inhibit proline oxidation *via* proline dehydrogenase at the plasma membrane level in a prokaryotic cell, thus inhibiting bacterial growth (Kwon et al. 2007). If this is the case, then the addition of proline could overcome the inhibition of proline analog-type phenolics with an aromatic ring structure.

This study was undertaken to investigate, for the first time, the *in vitro* anti-biofilm potential of gallic, caffeic, and chlorogenic acids against *S. aureus* including clinical isolates of MRSA. The effect of phenolic acids was studied on biofilm formation and on 24 h-established biofilms, quantifying the total biomass of the biofilm and evaluating the metabolic activity of the biofilm cells. Moreover, the morphogenesis of biofilm cells was monitored by scanning electron microscope (SEM) and the free energy of adhesion between bacteria and polystyrene was studied using the method of sessile drop contact angle measurement. Additionally, the effect of sub-inhibitory concentrations of the phenolic acids on the inhibition of α -hemolysin production by the strains of *S. aureus* was studied. To complete the overview of this work, the potential mechanism of action of these compounds was evaluated using a flow cytometry approach and the proline assay.

Materials and methods

Phenolic acids

Gallic, caffeic, and chlorogenic acids were obtained from Sigma-Aldrich. In this work, gallic acid was dissolved in ultrapure water and caffeic and chlorogenic acids were tested in dimethyl sulfoxide (DMSO, Sigma).

Test microorganisms and culture media

Three strains of *S. aureus* were used in this study: one reference strain *S. aureus* ATCC 25923, purchased from the American Type Culture Collection (ATCC) and two MRSA-resistant clinical isolates, MRSA 10/08 and MRSA 12/08. Stock cultures were prepared and stored with 20% glycerol at -80°C . The strains were sub-cultured on Brain Heart Infusion (BHI) agar plates 24 h prior to any antimicrobial test and when cultured from stock, they were sub-cultured before use.

MIC determination

The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) value of the pure phenolic compounds (gallic, caffeic, and

chlorogenic acids) for the strains of *S. aureus* was determined using the microdilution method according to the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) standard protocol (M7-A6 2003).

Mechanism of action

Proline assay

The inoculum was prepared by direct suspension in sterile saline solution until a cell suspension of 0.5 McFarland ($\sim 1-2 \times 10^8$ CFU ml^{-1}) was obtained. Bacterial lawns of *S. aureus* were obtained in Petri dishes containing Müller-Hinton agar. Proline was added into the medium to a final concentration of 0, 0.5, 1.0, and 5.0 mM. Individual phenolic compounds (gallic acid, caffeic, and chlorogenic acids) were added to paper disks 6 mm in diameter (2.0 mg of phenolic acids per disk). Saturated disks were placed onto the surface of seeded agar plates. Plates were incubated at 37°C for 24 h. The diameter of inhibition zone surrounding each disk was measured and the zone of inhibition was determined (Kwon et al. 2007). Experiments were conducted in triplicate.

Exposure of bacteria to phenolic acids for study of flow cytometry

Bacterial suspensions for flow cytometry experiments were prepared according to the method previously described by Silva et al. (2011). *S. aureus* ATCC 25923 and MRSA 10/08 cells were obtained from exponentially growing cultures in BHI broth at 37°C and 250 rpm after growth for 3 h. Then, the cultures were centrifuged at 4,500 rpm for 10 min, washed with saline solution and resuspended in the same solution. These cell suspensions were used to inoculate tubes containing the appropriate antimicrobial concentrations in peptone water (0, 1, or $2 \times$ MIC) to obtain a final cell density of $\sim 1 \times 10^6$ CFU ml^{-1} . The inoculated tubes were incubated at 37°C for 30 min without shaking. Afterward, samples were centrifuged at 9,450 rpm for 15 min, washed, and resuspended in the appropriate buffer for flow cytometry. In all cases, control experiments were carried out in parallel with cells incubated in buffered peptone water either with DMSO or water and treated under the same conditions (Silva et al. 2011).

Bacterial cell counts

Serial dilutions of samples exposed to phenolic acids were prepared in sterile saline solution and plated according to the method of Silva et al. (2011). The plates were incubated at 37°C for 24 h, and the number of colonies was determined. To measure growth inhibition,

viability reduction was calculated from these data according to Bouhdid et al. (2009), where N_C is the bacterial count in the control sample.

Staining procedures for flow cytometry experiments

For assessment of membrane permeability, bacterial suspensions (1×10^6 CFU ml^{-1}) were incubated for 5 min at room temperature with $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of propidium iodide (PI) in phosphate buffered saline (PBS) (pH = 7.4). For the evaluation of membrane potential, bacterial suspensions were incubated for 5 min at room temperature with $0.5 \mu\text{g ml}^{-1}$ of bis-1,3-dibutylbarbutiric acid (BOX) in PBS (pH = 7.4). In the case of efflux activity staining, bacterial suspensions were incubated for 5 min at room temperature with $5 \mu\text{g ml}^{-1}$ of ethidium bromide (EB) in PBS (pH = 7.4). In order to assess respiratory activity, the suspensions were incubated with 5 mM of 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride (CTC) in BHI broth for 1 h at 37°C and 250 rpm. Heat-killed cells (70°C , 30 min) were used as a positive control for PI, BOX, and EB staining protocols and as a negative control for CTC staining. Cells in exponential growth phase were used as a negative control for PI, BOX, and EB and as a positive control for CTC staining. Prior to the flow cytometric analysis, all cell suspensions were washed once with PBS and resuspended in the same buffer. Experiments were conducted at least in duplicate (Silva et al. 2011).

Flow cytometry

After treatment with phenolic acids and staining, bacterial samples were analyzed on a BD Biosciences FACSCalibur as described by Silva et al. (2011). Acquisition was performed with CellQuest Pro Software based on light-scatter and fluorescence signals resulting from 15 mW laser illumination at 488 nm. Light-scatter measurements and fluorescence measurements were acquired logarithmically. Signals corresponding to forward and side scatter (FSC and SSC) and fluorescence were accumulated; the fluorescence signal (pulse and measurements) was collected by FL-1 (BOX) and FL-3 (PI, EB and CTC) bandpass filters. Threshold levels were set on SSC to eliminate noise or particles (ie cellular debris) much smaller than intact cells. Bacterial cells were gated according to FSC/SSC signals and samples were acquired at a low sample rate ($12 \mu\text{l min}^{-1}$) to ensure that the event rate was lower than $2,000 \text{ events s}^{-1}$. A total of 10,000 events was acquired for each sample (Silva et al. 2011).

Biofilm susceptibility assay

The biofilms of *S. aureus* were grown in 96-well flat-bottom polystyrene microtiter plates, using a

previously described method (Raja et al. 2011) with some modifications. Bacterial suspensions were prepared from the culture grown overnight and the turbidity of the suspension was adjusted to OD (610 nm) of 0.7 ($\approx 1 \times 10^9$ CFU ml^{-1}). Twofold serial dilutions of phenolic acids were prepared in a 100 μl volume in tryptone soya broth (TSB) supplemented with 0.5% glucose in the wells of a 96-well flat bottomed microtiter plate. Forty microliters of fresh TSB with 0.5% glucose were added to each well, followed by the addition of 60 μl of the above mentioned bacterial suspension. This resulted in the final inoculum of 6×10^7 CFU ml^{-1} in each well and the final concentrations of the compounds ranged from 4 to 1 mg ml^{-1} . The plate was incubated for 24 h at 37°C . The effect of phenolic acids was also examined on preformed biofilms (24 h). The biofilms were prepared by inoculating the suspension of *S. aureus* into the wells of a polystyrene microtiter plate as mentioned above. After incubation at 37°C for 24 h, the culture supernatant from each well was decanted and planktonic cells were removed by washing the wells with PBS. Twofold serial dilutions of phenolic acids were prepared in TSB with 0.5% glucose and 100 μl of each dilution were added to the biofilm in the wells. The plate was further incubated at 37°C for 24 h (Raja et al. 2011). Inoculum grown on culture medium was used as a positive control and only culture medium as a negative control for this assay.

Quantification of biomass of biofilm with crystal violet

After completion of incubation, planktonic cells were removed from each well by washing twice with PBS. The biofilms were fixed with methanol for 20 min, stained with 0.1% (wt/vol) crystal violet for 10 min, and rinsed three times with water. The formation of biofilm was quantified by the addition of 200 μl of 95% ethanol to the crystal violet-stained wells and recording the absorbance at 595 nm using a microplate reader (Raja et al. 2011).

Quantitation of viable cells in the biofilm by XTT assay

The 2H-tetrazolium-5-carboxanilide (XTT) assay was used to quantify the number of viable cells present in each of the biofilms formed in the presence of phenolic acids and also on 24 h-established biofilms following addition of phenolic acids, in comparison with antimicrobial-free controls. The biofilms were grown as described above and then the 96-well flat-bottomed polystyrene microtiter plate was rinsed twice with PBS to remove loosely attached cells. The wells of a 96-well plate were filled with 120 μl of filter-sterilized $100 \mu\text{g ml}^{-1}$ XTT and $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ of phenazine methosulphate solution, and the peg-plate was positioned into the wells and

incubated at 37 °C in the dark for 3 h to allow the conversion of XTT into its formazan derivative. Reduction of XTT was then measured at 492 nm using a microtitre plate reader. The proportion of viable cells in treated biofilms was calculated by comparing the reduction of XTT with that of antimicrobial-free control biofilms (Smith et al. 2009; Paiva et al. 2012).

Scanning electron microscopy

Polystyrene coupons (1 cm × 1 cm) were individually washed and submersed overnight in a 70% ethanol solution. Prior to use, coupons were exposed to UV radiation for 30 min. *S. aureus* ATCC 25923 culture was grown overnight in TSB supplemented with 0.5% glucose at 37 °C and then diluted in culture medium to an OD (610 nm) of 0.7. First, 300 µl of inoculum were added to each well of a 12-well tissue culture containing a coupon. Then, 500 µl of 4 mg ml⁻¹ gallic, caffeic, or chlorogenic acid solutions and 200 µl of fresh culture medium were added to the wells. The plates were incubated for 24 h at 37 °C. Afterwards, the wells were washed twice with PBS and the samples were immediately fixed in a solution of 4% formaldehyde and 2% glutaraldehyde in PBS for 3 h at room temperature. The coupons were then carefully washed with PBS, dehydrated in a graded ethanol series (25, 50, 70, 90, and 100%), and dried in a desiccator overnight. Finally, they were mounted on a stub, sputter-coated with gold, and examined with a SEM (Hitachi S-2700) (Jiang et al. 2012).

Contact angles measurements, and free energy of adhesion

The free energy of adhesion ($\Delta G_{\text{Adh}}^{\text{Total}}$) between the bacterial cells and the polystyrene surfaces was assessed according to the procedure previously implemented (Simões et al. 2008; Bayouh et al. 2006; Borges et al. 2012) with some modifications. To ascertain the bacterial surface properties, lawns of bacteria were prepared as described by Busscher et al. (1984). Briefly, the bacterial suspensions were prepared from the overnight cultures of the *S. aureus* strains in TSB with 0.5% glucose and the turbidity was adjusted to 0.7 OD₆₁₀. Then, 3 ml of this bacterial suspension were added to 5 ml of phenolic acid solution (in culture medium) and 2 ml of fresh TSB with 0.5% glucose to obtain a final concentration of each phenolic acid of 4 mg ml⁻¹. For the positive control, the bacteria were grown in the absence of phenolic acids. After 24 h at 37 °C, the bacterial substrata for measuring contact angles were prepared by collecting bacterial cells on a cellulose triacetate filter (pore diameter, 0.45 µm) to a density of 10⁸ cells mm⁻². To establish constant moisture content, the bacteria-containing filters were

placed in a Petri dish on the surface of a layer of 1% (wt/vol) agar in water containing 10% (vol/vol) glycerol until the filters were mounted on a holder (Busscher et al. 1984). Polystyrene surfaces were prepared for characterization by immersion in a solution of a commercial ammoniac-base detergent in ultrapure water; the surfaces were dried at 65 °C for 3 h. The contact angles of the bacteria and the polystyrene were determined by sessile drop contact angle measurement using a model OCAH 200 (DataPhysics) that allowed image acquisition and data analysis. The surface tension components of the bacteria and polystyrene were obtained by measuring the contact angles with three pure liquids. These measurements were carried out at room temperature (23 ± 2 °C) using deionized water, ethylene glycol, and diiodomethane as reference liquids. The surface tension components of the reference liquids were taken from the literature (Good & van Oss 1991). Contact angle data were obtained from at least three determinations for each liquid and for each experiment and using the thermodynamic approach of the Lifshitz–van der Waals and acid/base (AB) interactions, the total energy of adhesion $\Delta G_{\text{Adh}}^{\text{Total}}$ of a bacterium (B) to a substratum surface (S) in a suspending liquid (L) can be calculated as the sum of the LW component $\Delta G_{\text{Adh}}^{\text{LW}}$ and the AB component $\Delta G_{\text{Adh}}^{\text{AB}}$ (Bayouh et al. 2006):

$$\Delta G_{\text{Adh}}^{\text{Total}} = \Delta G_{\text{Adh}}^{\text{LW}} + \Delta G_{\text{Adh}}^{\text{AB}} \quad (1)$$

where

$$\Delta G_{\text{Adh}}^{\text{LW}} = \left(\sqrt{\gamma_{\text{B}}^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_{\text{S}}^{\text{LW}}} \right)^2 - \left(\sqrt{\gamma_{\text{B}}^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_{\text{L}}^{\text{LW}}} \right)^2 - \left(\sqrt{\gamma_{\text{S}}^{\text{LW}}} - \sqrt{\gamma_{\text{L}}^{\text{LW}}} \right)^2 \quad (2)$$

and

$$\Delta G_{\text{Adh}}^{\text{AB}} = 2 \left[\sqrt{\gamma_{\text{L}}^{\text{+}}} \left(\sqrt{\gamma_{\text{B}}^{\text{-}}} + \sqrt{\gamma_{\text{S}}^{\text{-}}} - \sqrt{\gamma_{\text{L}}^{\text{-}}} \right) + \sqrt{\gamma_{\text{L}}^{\text{-}}} \left(\sqrt{\gamma_{\text{B}}^{\text{+}}} + \sqrt{\gamma_{\text{S}}^{\text{+}}} - \sqrt{\gamma_{\text{L}}^{\text{+}}} \right) - \sqrt{\gamma_{\text{B}}^{\text{-}} \gamma_{\text{S}}^{\text{+}}} - \sqrt{\gamma_{\text{B}}^{\text{+}} \gamma_{\text{S}}^{\text{-}}} \right] \quad (3)$$

The thermodynamic approach prediction states that adhesion may occur if $\Delta G_{\text{Adh}}^{\text{Total}}$ is negative and it is energetically unfavorable if $\Delta G_{\text{Adh}}^{\text{Total}}$ is positive (Bayouh et al. 2006).

Hemolysin assay

This assay was performed using rabbit erythrocytes, which are 1,000 times more sensitive to *S. aureus* α -hemolysin than human erythrocytes (Qiu et al. 2011). Levels of α -hemolysin in bacterial culture supernatants

were determined based on the method of Qiu et al. (2010, 2011). Briefly, bacteria were grown in MHB supplemented with 0.5% Tween-80 at 37 °C for the control sample and with graded sub-inhibitory concentrations of phenolic acids, until they reached the post-exponential growth phase ($OD_{600} \sim 2.5$). Culture supernatants were harvested by centrifugation (5,600 rpm; 4 °C; 10 min) and a volume of 0.1 ml of culture supernatant was combined with 50 μ l of defibrinated rabbit blood. After 30 min at 37 °C, the unlysed blood cells were pelleted by centrifugation (3,000 rpm; room temperature; 10 min). The hemolytic activity was determined by reading the OD_{543} of the cell-free supernatant. The control supernatant served as 100% hemolysis, and the relative percentage hemolysis values were calculated by comparison with this value (Qiu et al. 2010, 2011).

Cytotoxic evaluation – hemolysis test

Freshly obtained (in EDTA) human blood (A, Rh+) was washed three times by centrifugation (2,500 rpm for 10 min) in PBS at room temperature (20–25 °C). The supernatant was removed and a 10% red blood cell (RBC) suspension was prepared in PBS (1 \times). Aliquots of 1 ml of the 10% RBC suspension together with 200 μ l of phenolic acids at three different concentrations (0.1, 1, and 10 mg ml⁻¹) were shaken in a water bath at 37 °C for 30 min. Next, 40 μ l of 2.5% glutaraldehyde were added to the mixture to stop the reaction. Then, samples were centrifuged at 2,500 rpm for 15 min to allow broken membranes and unbroken cells to settle at the bottom. The supernatant was removed and the liberated hemoglobin in the supernatant was measured spectrophotometrically as absorbance at 541 nm. For 100% hemolysis or the positive control, 200 μ l of 0.2% Triton (in PBS) were added to 1 ml of a 10% RBC suspension. For the negative control (0% hemolysis), only 200 μ l of PBS and 1 ml of 10% RBC suspension were used. The experiment was done in triplicate and the mean \pm standard deviation (SD) was calculated as follows: % Hemolysis = (Absorbance of sample/Absor-

bance of positive control) \times 100 (Sharma & Sharma 2001).

Results and discussion

Antimicrobial activity and mechanism of action

The *in vitro* antibacterial activities of the phenolic acids were tested on three strains of *S. aureus*: one reference strain and two clinical isolates of MRSA strains (Table 1). Gallic acid was the most active compound of the phenolic acids tested against *S. aureus* strains, presenting the lowest MIC value (4 μ g ml⁻¹); whereas chlorogenic acid presented the poorest antibacterial activity showing MIC values of 500 μ g ml⁻¹. Phytochemicals are routinely classified as antimicrobials on the basis of susceptibility tests that produce inhibitory concentrations in the range of 100–1,000 μ g ml⁻¹ (Borges et al. 2012). In this sense, these phenolic acids could effectively be classified as antimicrobials.

Regarding the results obtained for the proline assay, proline reversed the inhibitory effects of gallic acid against strains of *S. aureus* (Table 2) indicating that the site of action could be at the proline dehydrogenase level. This test could indicate a potential mechanism of action of the phenolic acids in microorganisms and elucidate its antibacterial properties against *S. aureus*. These results were similar to those obtained by Kwon et al. (2007), in which they observed the same proline reverse inhibitory effect, with extracts of clonal herbs of the family Lamiaceae and its pure compounds against strains of *S. aureus*.

Table 1. MIC values of pure phenolic acids (modal values: n = 3).

MIC (μ g ml ⁻¹)	Gallic acid	Caffeic acid	Chlorogenic acid
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	4.0	62.5	500.0
MRSA 10/08	4.0	62.5	500.0
MRSA 12/08	4.0	250	500.0

Table 2. Effect of gallic, caffeic, and chlorogenic acids on inhibition of *S. aureus* in the presence of proline (modal values: n = 3).

Inhibition zones (mm)	Gallic acid	Caffeic acid	Chlorogenic acid	Gallic acid	Caffeic acid	Chlorogenic acid
	0 mM proline			0.5 mM proline		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	15	7	6	15	6	6
MRSA 10/08	18	8	6	17	8	6
MRSA 12/08	28	8	6	24	6	6
	1.0 mM proline			5.0 mM proline		
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	15	6	6	8	6	6
MRSA 10/08	16	7	6	15	6	6
MRSA 12/08	22	6	6	20	6	6

Flow cytometry was used to further elucidate the mechanism of action of the studied phenolic acids on membrane integrity, membrane potential, efflux, and the respiratory activities of cells of *S. aureus*. *S. aureus* ATCC 25923 was treated with caffeic acid and MRSA 10/08 with gallic acid. This choice of strains and test compounds can be explained by the fact that time-kill curves (data not shown) showed that caffeic and gallic acid presented bacteriostatic activity against *S. aureus* ATCC 25923 and MRSA 10/08, respectively, with no effect being observed for the other strains of *S. aureus* and compound combinations. Therefore, since no growth inhibition was observed for MRSA 12/08 with all compounds, MRSA 10/08 with caffeic and chlorogenic acids and *S. aureus* ATCC 25923 with gallic and chlorogenic acids, these assays were disregarded for flow cytometry. PI was used to assess bacterial membrane integrity because if membrane integrity is compromised PI can enter the cell where it will bind to nucleic acids (Silva et al. 2011). BOX was used to evaluate membrane potential, since polarized cells are able to exclude anionic molecules, such as BOX, and depolarized cells allow the accumulation of BOX inside the bacterial cell (Silva et al. 2011). Efflux activity was measured using EB and respiratory activity was studied with CTC, because viable bacterial cells are able to reduce CTC resulting in the production of an insoluble fluorescent CTC-formazan product (Silva et al. 2011).

In the case of *S. aureus* ATCC 25923, caffeic acid increased membrane permeability, depolarized cell membranes, and reduced respiratory activity. After treatment with 2× MIC of caffeic acid, the percentage of PI-positive stained cells (11.63%) was higher than with 0× MIC (2.98%) and 1× MIC (2.86%) (Table 3), indicating that caffeic acid can damage cell membrane integrity in *S. aureus* cells. Moreover, the percentage of depolarized cells (BOX-positive) was higher (Table 3) in the presence of the compound, which means that caffeic acid also caused membrane depolarization. The percentage of BOX-positive cells with 2× MIC is 74.43%, indicating that almost all cells were depolarized. The loss of

membrane potential is a prior event to membrane permeabilization; therefore, since caffeic acid led to the loss of membrane integrity to some extent, membrane depolarization was also expected. After incubation with caffeic acid, a marked decrease in the percentage of CTC-reducing cells was observed (Table 3). With 2× MIC of caffeic acid, the respiratory activity is about half the value obtained for 0× MIC, indicating that the viability of *S. aureus* was significantly compromised, corroborating the viability reduction results (Table 3). Regarding efflux activity, EB staining showed that with 2× MIC the mean of fluorescence intensity (MFI) was higher (168.61) than with 0× MIC (108.87), indicating that efflux activity is reduced in the presence of caffeic acid. As caffeic acid was dissolved in DMSO, an assay without DMSO was performed and it was observed that this solvent slightly increased the number of depolarized cells (BOX-positive) and affected the efflux and respiratory activities. Overall, the correlation between loss of membrane potential, membrane permeability, the ability to reduce CTC, and the reduction in cell viability indicates that caffeic acid inhibits the growth of *S. aureus* ATCC 25923 by disrupting membrane function, and so all its functions are compromised not only as a barrier but also as a matrix for enzymes and as an energy transducer. Similar conclusions were reached by other researchers attempting to explain the antibacterial action of bioactive compounds using flow cytometry (Nguefack et al. 2004; Hayouni et al. 2008). In addition, caffeic acid is a phenolic acid that behaves as a nucleophile (Borges et al. 2012) and can attack the bacterial membrane, disrupting its functions, so, the results now obtained by flow cytometry are in agreement with the chemical characteristics of phenolic acids.

In the case of MRSA 10/08, gallic acid appeared not to cause damage to the bacterial membrane (Table 3) as PI- and BOX-positive cells did not increase in the presence of this compound. However, the respiratory activity was affected with 1× MIC and 2× MIC, as can be seen by the percentage of CTC-reducing cells which was only 14.60% and 15.36%, respectively. Efflux activity seemed

Table 3. Percentage of fluorochrome-stained cells assessed by flow cytometry and viability reduction evaluated by means of the drop-plating method of *S. aureus* strains treated with caffeic and gallic acids (mean values ± SD: n = 2).

Strain	Compound	Phenolic concentration	Viability reduction (%)	Stained cells (%)		
				PI	BOX	CTC
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Caffeic acid	0× MIC	–	2.98 ± 0.34	14.58 ± 1.53	92.35 ± 0.12
		1× MIC	21.00 ± 1.41	2.86 ± 0.21	23.11 ± 3.90	75.95 ± 1.22
		2× MIC	53.60 ± 5.09	11.63 ± 1.91	74.73 ± 0.47	45.59 ± 4.33
MRSA 10/08	Gallic acid	Control without DMSO	–	3.78 ± 0.00	4.81 ± 0.52	98.86 ± 0.01
		0× MIC	–	1.60 ± 0.08	3.38 ± 0.30	95.38 ± 1.12
		1× MIC	97.60 ± 1.97	1.00 ± 0.14	2.75 ± 0.31	14.60 ± 0.91
		2× MIC	99.13 ± 1.00	0.76 ± 0.06	5.33 ± 0.23	15.36 ± 0.38

to be increased in the presence of gallic acid, since MFI decreased with 1× MIC (33.15) and 2× MIC (35.46) when compared with 0× MIC (78.87). The treatment with gallic acid reduced the viability of MRSA cells up to 95%, indicating a high decrease in cell cultivability. However, the results of flow cytometry assays revealed that this loss of cultivability was not caused by damage to the bacterial membrane, suggesting another cell target for gallic acid in MRSA cells, such as the inhibition of protein or DNA synthesis.

The results of flow cytometry are in agreement with the results obtained from the proline assays. This work revealed that these phenolic acids could inhibit proline oxidation, resulting in the disruption of critical energy metabolism which can be corroborated by the reduction in the percentage of metabolic activity of *S. aureus* observed by flow cytometry. Despite its action in cell metabolism, caffeic acid was also able to damage bacterial cell membranes.

Anti-biofilm activity

The assays performed on cells in suspension showed an effective antistaphylococcal activity of the test compounds. However, as strains of *S. aureus* are known to form biofilms, the next step in the present study was to evaluate the effect of the phenolic acids on formation of *S. aureus* biofilm and on 24 h-established biofilms. Biofilm cells are known to be extremely resistant to antimicrobial agents and for this reason the concentrations of phenolic acids used were standardized independently of MIC value. The results obtained for anti-biofilm activity (Table 4) led to the conclusion that gallic acid at 4 mg ml⁻¹ reduced the formation of biofilm by about 40% for all the strains of *S. aureus* tested. Caffeic and chlorogenic acids at the same concentration were able to reduce the biofilm biomass by 80%. Regarding the effect against 24 h-established biofilms, gallic acid did not have any effect on the total biomass of *S. aureus* ATCC 25923 biofilm, but slightly decreased the biomass of

Table 4. Effect of different concentrations of phenolic acids on formation of biofilms and on 24 h-established biofilms (mean values ± SD; n = 3).

	Compound	mg ml ⁻¹	Formation of biofilms		24 h-Established biofilms		
			Crystal violet (OD ₅₉₅)	XTT (OD ₄₉₂)	Crystal violet (OD ₅₉₅)	XTT (OD ₄₉₂)	
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Gallic acid	4	0.61 ± 0.15	0.20 ± 0.06	1.49 ± 0.27	0.11 ± 0.05	
		2	0.62 ± 0.14	0.21 ± 0.04	1.37 ± 0.47	0.17 ± 0.09	
	Caffeic acid	1	0.85 ± 0.15	0.24 ± 0.10	1.31 ± 0.29	0.18 ± 0.08	
		4	0.15 ± 0.04	0.06 ± 0.01	0.78 ± 0.22	0.07 ± 0.01	
	Chlorogenic acid	2	0.28 ± 0.11	0.08 ± 0.03	0.89 ± 0.16	0.09 ± 0.03	
		1	0.58 ± 0.14	0.12 ± 0.07	0.94 ± 0.32	0.19 ± 0.09	
	Positive control	4	0.17 ± 0.07	0.07 ± 0.01	0.78 ± 0.10	0.10 ± 0.05	
		2	0.28 ± 0.11	0.10 ± 0.05	0.90 ± 0.23	0.14 ± 0.07	
	Negative control	1	0.57 ± 0.16	0.16 ± 0.07	0.92 ± 0.10	0.20 ± 0.08	
			0.98 ± 0.17	0.47 ± 0.10	1.20 ± 0.50	0.31 ± 0.09	
	MRSA 10/08	Gallic acid	4	0.54 ± 0.05	0.11 ± 0.06	1.19 ± 0.49	0.11 ± 0.01
			2	0.80 ± 0.17	0.16 ± 0.03	1.14 ± 0.37	0.13 ± 0.06
Caffeic acid		1	0.82 ± 0.12	0.21 ± 0.01	1.19 ± 0.49	0.21 ± 0.05	
		4	0.14 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.85 ± 0.17	0.07 ± 0.01	
Chlorogenic acid		2	0.27 ± 0.05	0.10 ± 0.04	0.89 ± 0.35	0.09 ± 0.03	
		1	0.48 ± 0.18	0.13 ± 0.04	0.94 ± 0.29	0.25 ± 0.06	
Positive control		4	0.15 ± 0.03	0.15 ± 0.07	0.73 ± 0.29	0.10 ± 0.03	
		2	0.26 ± 0.08	0.12 ± 0.05	0.82 ± 0.18	0.12 ± 0.06	
Negative control		1	0.33 ± 0.18	0.16 ± 0.06	1.00 ± 0.48	0.24 ± 0.05	
			0.89 ± 0.19	0.30 ± 0.06	1.26 ± 0.50	0.26 ± 0.10	
MRSA 12/08		Gallic acid	4	0.50 ± 0.03	0.11 ± 0.02	0.86 ± 0.34	0.12 ± 0.02
			2	0.55 ± 0.15	0.11 ± 0.02	0.87 ± 0.21	0.12 ± 0.04
	Caffeic acid	1	0.54 ± 0.17	0.15 ± 0.03	1.18 ± 0.28	0.14 ± 0.04	
		4	0.15 ± 0.02	0.07 ± 0.01	0.84 ± 0.25	0.09 ± 0.02	
	Chlorogenic acid	2	0.25 ± 0.08	0.08 ± 0.02	0.88 ± 0.26	0.11 ± 0.03	
		1	0.51 ± 0.15	0.10 ± 0.03	0.95 ± 0.20	0.15 ± 0.04	
	Positive control	4	0.14 ± 0.03	0.09 ± 0.03	0.72 ± 0.08	0.09 ± 0.05	
		2	0.23 ± 0.03	0.10 ± 0.04	0.77 ± 0.08	0.09 ± 0.03	
	Negative control	1	0.23 ± 0.04	0.19 ± 0.07	0.88 ± 0.18	0.16 ± 0.07	
			0.99 ± 0.17	0.22 ± 0.05	1.12 ± 0.50	0.22 ± 0.06	
			0.20 ± 0.05	0.07 ± 0.01	0.34 ± 0.13	0.08 ± 0.04	

biofilm of both strains of MRSA. However, caffeic and chlorogenic acids reduced the biofilm biomass by almost 60%, when compared with the positive control, for all strains of *S. aureus*. When the biofilms were grown in the presence of the phenolic acids, the metabolic activity (XTT assay) of adherent cells was affected, even at low concentrations of the compounds. This effect was more pronounced in the ATCC strain than in the MRSA strains. When the compounds were added to 24 h-established biofilms, the metabolic activity (XTT assay) also decreased and again this reduction was more pronounced in the ATCC strain, showing that the MRSA strains were more resistant to the phenolic acids. The effect of caffeic and chlorogenic acids was more evident than that of gallic acid. Generally, it was observed that crystal violet values were higher in 24 h-established biofilms, indicating higher biomass due to the previous growth of these biofilms. On the other hand, since the XTT assay only

evaluates cell state and not cell growth, the metabolic activity of these biofilms was the same or less, as the cells in the biofilms began to approach the death phase.

Morphogenesis of *S. aureus* biofilm cells was monitored by SEM (Figure 1). The results demonstrate the destruction of the 3D structure of the biofilm when the compounds are present at the time of biofilm formation. Cells exposed to 4 mg ml⁻¹ of the phenolic acids produced scant biofilms, which were composed of only a few bacterial cells. Moreover, in the presence of phenolic acids, it is possible to observe marked damage to the cell wall of the bacteria, leading to the loss of the coccus shape, when compared with the biofilm of the positive control. The SEM images prove that phenolic acids had an effect on biofilm formation and confirm the results obtained with crystal violet and the XTT method, which demonstrate that the phenolic acids reduce both the biomass and viability of biofilms.

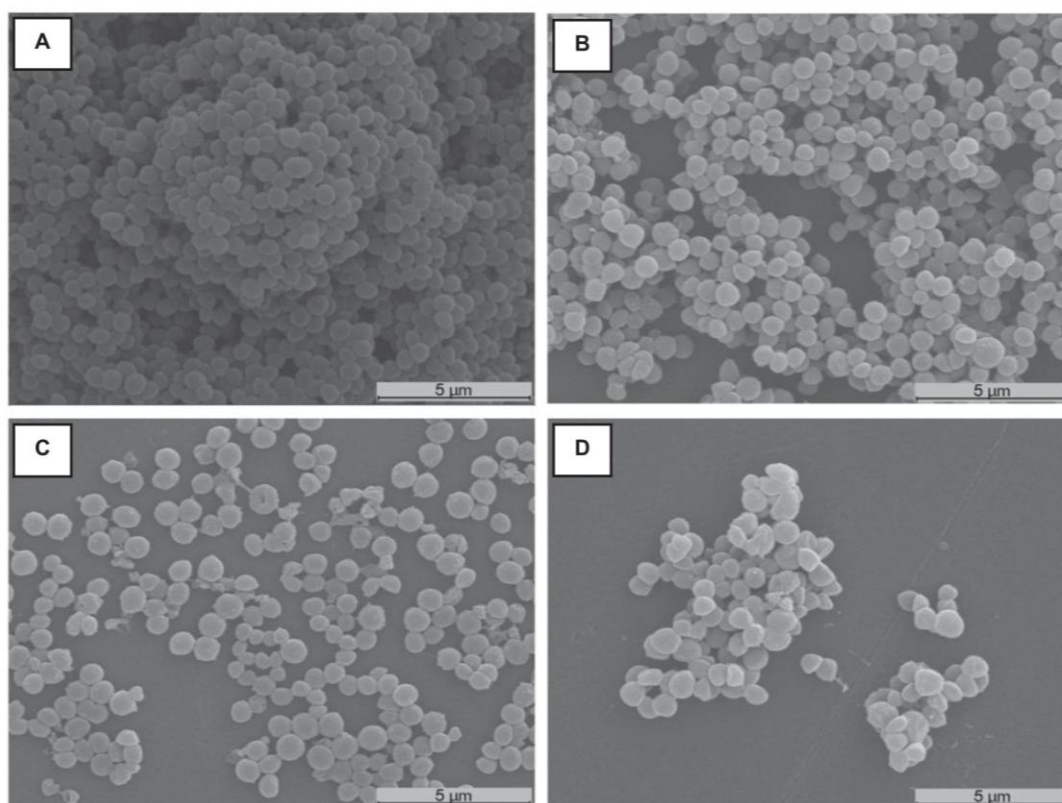


Figure 1. SEM images: A = uniformly distributed *S. aureus* ATCC 25923 biofilm on polystyrene coupons (positive control); B = biofilm formed in the presence of gallic acid; C = biofilm formed in the presence of caffeic acid; D = biofilm formed in the presence of chlorogenic acid.

Table 5. Adhesion potential of bacteria to polystyrene with and without treatment with phenolic acids.

ΔG_{Adh}^{Total} (mN ml ⁻¹)	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	MRSA 10/08	MRSA 12/08
Positive control	-0.45	-4.10	-7.38
Gallic acid	-7.94	-9.40	-3.61
Caffeic acid	-11.87	-19.06	-14.79
Chlorogenic acid	-11.19	-12.04	-13.36

Note: $\Delta G_{Adh}^{Total} < 0$ – thermodynamically favorable adhesion; $\Delta G_{Adh}^{Total} > 0$ – thermodynamically unfavorable adhesion.

Effect of phenolic acids on adhesion properties

The understanding of the overall process of formation of biofilm depends in turn on a deep understanding of the main aspects regulating biofilm development, such as initial adhesion. Bacterial adhesion to surfaces has been studied extensively (Bayouhd et al. 2006; Simões et al. 2007, 2008; Borges et al. 2012). Adhesion is a complex process that is affected by many factors, including the physico-chemical characteristics of bacteria, the surface properties of the material, and environmental factors (Simões et al. 2008; Borges et al. 2012). In this work, the effects of gallic, caffeic, and chlorogenic acids on the adhesion potential of *S. aureus* to polystyrene (Table 5) was determined by characterization of the free energy of adhesion according to a thermodynamic approach. It can be concluded that the strains of *S. aureus* studied had the theoretical thermodynamic ability to adhere to polystyrene ($\Delta G_{Adh}^{Total} < 0$ mN m⁻¹) and then to form biofilms. When exposed to the phenolic acids, the ΔG_{Adh}^{Total} for all strains of *S. aureus* decreased, except in the case of MRSA 12/08 treated with gallic acid, in which case the ΔG_{Adh}^{Total} increased, meaning that the adhesion capacity to polystyrene of MRSA12/08 decreased with gallic acid. These distinct values of ΔG_{Adh}^{Total} were apparently related to the distinct physico-chemical properties of the surface of the cell. Therefore, the nucleophilic attack by phenolic acids resulted in opposite effects when comparing the ΔG_{Adh}^{Total} of MRSA12/08 treated with gallic acid and the remaining samples as described previously by Borges et al. (2012).

Inhibition of α -hemolysin production

α -hemolysin, one of the major virulence factors, is secreted by *S. aureus* and can promote hemolysis of rabbit erythrocytes. Therefore, a hemolysis assay was used to investigate the effect of phenolic acid treatment on the hemolytic activity of culture supernatants of *S. aureus*. As shown in Table 6, when supplemented with sub-MIC concentrations of phenolic acids, the hemolytic activities of the culture supernatants of strains of *S. aureus* was reduced, with the exception of chlorogenic acid, which did not inhibit production of α -hemolysin. A

Table 6. Hemolytic activities of α -hemolysin produced by *S. aureus* cultured with graded sub-inhibitory concentrations of phenolic acids (mean values \pm SD: n = 3).

		Inhibition of production of α -hemolysin (%)		
Strain	Compound	1/8 MIC	1/4 MIC	1/2 MIC
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	Gallic acid	7.89 \pm 1.04	14.56 \pm 2.90	24.41 \pm 7.68
	Caffeic acid	9.90 \pm 1.70	22.97 \pm 6.49	57.16 \pm 8.65
	Chlorogenic acid	0	0	0
MRSA 10/08	Gallic acid	6.78 \pm 0.29	5.22 \pm 0.92	18.07 \pm 2.65
	Caffeic acid	2.67 \pm 0.69	4.10 \pm 0.25	62.70 \pm 7.72
	Chlorogenic acid	0	0	0
MRSA 12/08	Gallic acid	6.37 \pm 1.63	10.91 \pm 3.02	20.67 \pm 6.19
	Caffeic acid	4.76 \pm 1.14	11.81 \pm 2.48	92.53 \pm 7.76
	Chlorogenic acid	0	0	0

dose-dependent inhibition of hemolysis can be observed for all tested strains when treated with gallic and caffeic acids. These results are consistent with previous studies dealing with the inhibition of production of α -hemolysin by strains of *S. aureus* (Qiu et al. 2010, 2011).

Toxicity of phenolic acids

Given the good antibacterial activity of the phenolic acids under study, namely their action against biofilms of *S. aureus*, the use of these compounds can be anticipated for medical purposes as disinfectants to prevent, control, or eradicate biofilms of *S. aureus*, including the emergent strains of MRSA in hospitals or, even for industrial purposes, as additives to prevent microbial growth and, in this way, avoiding food poisoning caused by *S. aureus*. To be considered as such, they cannot be cytotoxic, or their toxicity must be minimal. It is well known that these phenolic acids are commonly found in food, namely vegetables, tea, and coffee and in traditional medical infusions or decoctions (Andrade et al. 2009; Luis et al. 2011), with no described toxic properties. However, to further support the findings, a hemolysis

Table 7. Percentage of hemolysis in the presence of different concentrations of phenolic acids (mean values \pm SD: n = 3).

Compound	Concentration (mg ml ⁻¹)	Hemolysis
Gallic acid	10	2.76 \pm 0.38
	1	6.08 \pm 0.44
	0.1	3.87 \pm 0.63
Caffeic acid	10	91.95 \pm 1.44
	1	2.66 \pm 0.63
	0.1	2.56 \pm 0.53
Chlorogenic acid	10	85.25 \pm 1.34
	1	2.32 \pm 0.23
	0.1	2.97 \pm 1.42
Positive control		100.00 \pm 0.00
Negative control		2.78 \pm 0.43

assay was performed to prove the absence of toxicity. The mechanical stability of the erythrocytic membrane is a good indicator of the effect of various *in vitro* damage levied on it by various compounds for screening of cytotoxicity and is dependent on its physical and structural properties (Sharma & Sharma 2001). As can be seen in Table 7, for the biologically active concentrations of phenolic acids, with the exception of gallic acid, there is no hemolysis, except in the case of 10 mg ml⁻¹ where the percentage of hemolysis greatly increased. These results indicate that the phenolic acids are not toxic to human erythrocytes.

Overall, in the present work, the beneficial bioactivity of three phenolic acids (gallic, caffeic, and chlorogenic) commonly present in human food was effectively proved. The antimicrobial activity of these compounds against *S. aureus* has been demonstrated on both planktonic and biofilm cells. Moreover, the possible mechanism of action of these phenolic acids on *S. aureus* cells was elucidated, allowing a more comprehensive application of these compounds as antimicrobials, and the results described can represent the basis for the promising use of these compounds in therapeutic or food applications.

Acknowledgments

Ángelo Luís acknowledges a PhD fellowship from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Reference: SFRH/BD/65238/2009), co-funded by the Fundo Social Europeu (POPH – QREN), and by national funds of the Ministério da Educação e Ciência and also Larissa Léa da Silva for the support in part of the experimental work. Filomena Silva acknowledges a post-doctoral fellowship (SFRH/BPD/79250/2011) from Fundação para a Ciência e Tecnologia within the scope of QREN – POPH – Advanced Formation programs co-funded by the Fundo Social Europeu and MEC. The authors also wish to thank Eng. Ana Paula Gomes, from the Centro de Óptica of the Universidade da Beira Interior, for help in SEM image acquisition. This work was partially supported by the project [PEst-C/SAU/UI0709/2011] funded by the Fundação para a Ciência e a Tecnologia through the program COMPETE.

References

- Andrade D, Gil C, Breitenfeld L, Domingues F, Duarte AP. 2009. Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L. *Ind Crops Prod.* 30:165–167.
- Bayouhd S, Othmane A, Bettaieb F, Bakhrouf A, Ouada HB, Ponsonnet L. 2006. Quantification of the adhesion free energy between bacteria and hydrophobic and hydrophilic substrata. *Mat Sci Eng C.* 26:300–305.
- Borges A, Saavedra M, Simões M. 2012. The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria. *Biofouling.* 28:37–41.
- Bouhdid S, Abrini J, Zhiri A, Espuny M, Manresa A. 2009. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. *J Appl Microbiol.* 106:1558–1568.
- Busscher HJ, Weerkamp H, van der Mei H, van Pelt A, Jong H, Arends J. 1984. Measurement of the surface free energy of bacterial cell surfaces and its relevance for adhesion. *Appl Environ Microbiol.* 48:980–983.
- CLSI M7-A6. 2003. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard. 6th ed. 23, 2. Wayne (PA): Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Cotter JJ, Maguire P, Soberon F, Daniels S, O’Gara JP, Casey E. 2011. Disinfection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms using a remote non-thermal gas plasma. *J Hos Infect.* 78:204–207.
- Gonthier MP, Remesy C, Scalbert A, Cheynier V, Souquet JM, Poutanen K, Aura M. 2006. Microbial metabolism of caffeic acid and its esters chlorogenic and caftaric acids by human faecal microbiota *in vitro*. *Biomed Pharmacother.* 60:536–540.
- Good RJ, van Oss CJ. 1991. The modern theory of contact angles and the hydrogen bond components of surface energies. In: Loeb GL, Schrader ME, editors. *Modern approaches to wettability: theory and applications.* New York (NY): Plenum Press; p. 1–27.
- Hayouni E, Bouix M, Abedrabba M, Leveau J, Hamdi M. 2008. Mechanism of action of *Melaleuca armillaris* (Sol. Ex Gaertn) Sm. essential oil on six lab strains as assessed by multiparametric flow cytometry and automated microtiter-based assay. *Food Chem.* 111:707–718.
- Jiang C, Schaudinn C, Jaramillo D, Webster P, Costerton J. 2012. *In vitro* antimicrobial effect of a cold plasma jet against *Enterococcus faecalis* biofilms. *IRSN Dentistry.* 2012:295736. doi:10.5402/2012/295736.
- Kwon I, Apostolidis E, Labbe R, Shetty K. 2007. Inhibition of *Staphylococcus aureus* by phenolic phytochemicals of selected clonal herbs species of Lamiaceae family and likely mode of action through proline oxidation. *Food Biotechnol.* 21:71–89.
- Luís Á, Duarte AP, Domingues F. 2011. Bioactive compounds, RP-HPLC analysis of phenolics, and antioxidant activity of some portuguese shrub species extracts. *Nat Prod Commun.* 6:1863–1872.
- Nguefack J, Budde B, Jakobsen M. 2004. Five essential oils from aromatic plants of Cameroon: their antibacterial activity and ability to permeabilize the cytoplasmic membrane of *Listeria innocua* examined by flow cytometry. *Lett Appl Microbiol.* 39:395–400.
- Paiva L, Vidigal P, Donatti L, Svidzinski T, Consolaro M. 2012. Assessment of *in vitro* biofilm formation by *Candida* species isolates from vulvovaginal candidiasis and ultrastructural characteristics. *Micron.* 43:497–502.
- Qiu J, Wang D, Xiang H, Feng H, Jiang Y, Xia L, Dong J, Lu J, Yu L, Deng X. 2010. Subinhibitory concentrations of thymol reduce enterotoxins A and B and alpha-hemolysin production in *Staphylococcus aureus* isolates. *PLoS ONE.* 5:e9736. doi:10.1371/journal.pone.0009736
- Qiu J, Zhang X, Luo M, Li H, Dong J, Wang J, Leng B. 2011. Subinhibitory concentrations of *Perilla* oil affect the expression of secreted virulence factor genes in *Staphylococcus aureus*. *PLoS ONE.* 6:e16160. doi:10.1371/journal.pone.0016160
- Quave C, Plano L, Pantuso T, Bennett B. 2008. Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J Ethnopharmacol.* 118:418–428.

- Raja A, Ali F, Khan I, Shawl A, Arora D, Shah B, Taneja S. 2011. Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of acetyl-11-keto- β -boswellic acid from *Boswellia serrata*. BMC Microbiol. 11:54. doi:10.1186/1471-2180-11-54
- Sandasi M, Leonard C, Viljoen M. 2010. The *in vitro* antibiofilm activity of selected culinary herbs and medicinal plants against *Listeria monocytogenes*. Lett Appl Microbiol. 50:30–35.
- Sharma P, Sharma J. 2001. *In vitro* hemolysis of human erythrocytes by plant extracts with antiplasmodial activity. J Ethnopharmacol. 74:239–243.
- Silva F, Ferreira S, Queiroz J, Domingues F. 2011. Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. J Med Microbiol. 60:1479–1486.
- Simões L, Simões M, Oliveira R, Vieira M. 2007. Potential of the adhesion of bacteria isolated from drinking water to materials. J Basic Microbiol. 47:174–183.
- Simões M, Simões L, Cleto S, Pereira M, Vieira M. 2008. The effects of a biocide and a surfactant on the detachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass surfaces. Int J Food Microbiol. 121:335–341.
- Smith K, Perez A, Ramage G, Gemmel C, Lang S. 2009. Comparison of biofilm-associated cell survival following *in vitro* exposure of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilms to the antibiotics clindamycin, daptomycin, linezolid, tigecycline and vancomycin. Int J Antimicrob Agents. 33:374–378.

2.7. Propriedades biológicas dos alquilresorcinóis: Mini-revisão

Artigo 6

Biological Properties of Alkylresorcinols

Ângelo Luís, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues

Submetido à revista *Phytochemistry* na categoria de “Short Review
- *Molecules of Interest*”

Biological Properties of Alkylresorcinols

Short Review - Molecules of Interest

Ângelo Luís, Ana Paula Duarte, Fernanda Domingues*

CICS-UBI - Health Sciences Research Centre, University of Beira Interior, Av. Infante
D. Henrique, 6200-506 Covilhã, Portugal

*Corresponding author: tel.: +351 275 319 827; fax: +351 275 319 730; e-mail:

fdomingues@ubi.pt

Abstract

Alkylresorcinols are members of a family of compounds referred to as phenolic lipids, which have been identified in numerous plant, fungal and bacterial species. In higher plants, alkylresorcinols typically occur as mixtures of homologues possessing side chains of 13 to 27 carbons with varying degrees of saturation.

The potent antimicrobial activity demonstrated for many naturally occurring alkylresorcinols and alkylresorcinol derivatives has led to the widely held view that these compounds primarily serve a defensive role in plants. Previous studies led to the isolation and identification of 5-alkylresorcinols that cleave DNA. Additionally, in the literature, there are several other biological effects attributed to resorcinol derivatives, namely, antimicrobial, cytotoxic, anticarcinogenic, antiproliferative, antileishmanial and antioxidant properties.

This review intends to outline the biological activities of most relevant alkylresorcinols isolated from plants and propose future directions for subsequent studies regarding the effective biological effects of this class of compounds.

Keywords: resorcinols, alkylresorcinols, biological properties

1. General aspects of alkylresorcinols

The 5-n-alkylresorcinols (Figure 1) occur naturally in many higher plant families, bacteria and fungi. They were reported in grains of cereals such as wheat, barley and rye (gramineaceous plants). The molecular structure of 5-n-alkylresorcinols consists of a benzene ring with two hydroxyl groups at positions 1 and 3, along with an odd-numbered alkyl chain at position 5 (Bondia-Pons et al. 2009; Sampietro et al. 2013). This structure confers amphiphilic properties to alkylresorcinols, allowing them to form monolayers and to be inserted into phospholipidic membranes (Bondia-Pons et al. 2009). These compounds have been suggested as potential markers for wholegrain wheat and rye in food products or for checking contamination of nongluten containing cereals with gluten containing cereals such as wheat, rye, and barley (Sampietro et al. 2013).

The 5-n-alkylresorcinols and 5-n-alkenylresorcinols are higher homologues of cardol and bilobol. Homologues with 19 to 29 carbon atoms in the aliphatic radical were found in cereal grains (Kozubek 1987). The homologues with saturated chains are predominant; however 5-n-alkylresorcinols and 5-n-alkenylresorcinols contain significant amounts of mono- and di-olefinic homologues. 5-n-Alkylresorcinols and 5-n-alkenylresorcinols from rye grain are supposed to be responsible for the harmful effect that rye has in animals (Kozubek 1987).

Alkenylresorcinols show high affinity to liposome and erythrocyte membranes, increasing their permeability to ions. The membrane-perturbing activity of alkenylresorcinols is several times higher than that of related saturated derivatives. On the other hand, alkenylresorcinols show strong hemolytic activity upon erythrocytes (Kozubek 1987).

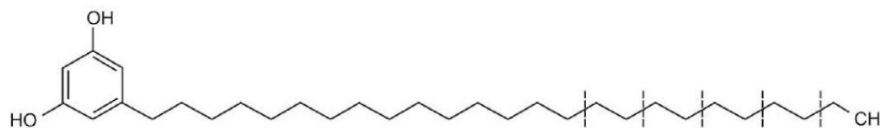


Figure 1: Chemical structure of alkylresorcinols (Bondia-Pons et al. 2009).

2. Alkylresorcinols biosynthesis

Alkylresorcinols, as well as all other classes of phenolic lipids, are thought to be derived predominantly from type III polyketide synthase (PKS)-associated pathways. In plants, type III PKS enzymes are involved in the biosynthesis of a vast array of natural products, including flavonoids resulting from the important branch metabolite 2',4,4',6'-tetrahydroxychalcone, the product of the enzyme chalcone synthase. Type III PKSs which produce 5-n-alkylresorcinols from fatty acyl-CoA starter units are termed alkylresorcinol synthases (ARSs) (Baerson et al. 2010).

The diversity of natural products produced by various type III PKSs is due in part to differences in the type of intramolecular cyclization reactions performed by specific enzymes (Baerson et al. 2010). The details of these reactions have attracted much interest in recent years, as PKSs involved in the biosynthesis of aromatic ring-containing intermediates mainly utilize either an aldol condensation-based mechanism (stilbene synthase or STS-type) or a Claisen condensation-based mechanism (chalcone synthase or CHS-type) for ring folding. ARSs use a STS-type cyclization mechanism, and may also generate pyrone by-products from specific acyl-CoA starters via intramolecular C5 oxygen → C1 lactonization (Figure 2) (Baerson et al. 2010).

The plant-specific CHS and STS enzymes were the first type III PKSs identified; however, as discovered later, the protein family is actually much bigger, since type III

PKSs have now been identified in numerous bacteria and fungi (Baerson et al. 2010). Among the functionally identified microbial enzymes, there is only one utilizing a Claisen condensation, but several utilizing aldol condensations. Several of these microbial enzymes have been characterized as ARSs, which is significant given that the microbial enzymes are to a large extent functionally identical to their plant counterparts (Baerson et al. 2010).

While this is not readily discernible from direct protein sequence comparisons (typically <30% amino acid identity occurs between microbial and plant ARSs), molecular modeling of the three dimensional structures suggests that similar active site elements are found within diverse ARSs that facilitate the acceptance of long-chain fatty acyl-CoA substrates (Baerson et al. 2010).

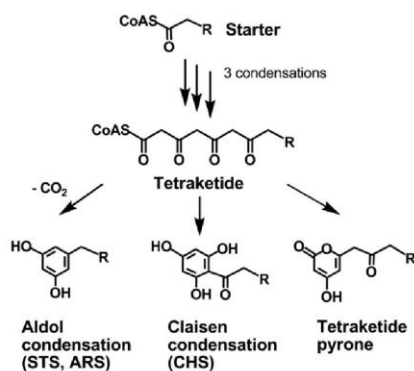


Figure 2: Reactions catalyzed by stilbenes synthase, alkylresorcinol synthase and chalcone synthase-type III PKS enzymes. All of these PKSs utilize a starter unit and perform three condensation reactions with malonyl-CoA as the extender unit, yielding a tetraketide intermediate. Alkylresorcinol synthases can also generate tetraketide pyrone side-products via C5 oxygen → C1 intramolecular lactonization; (STS, stilbene synthase; ARS, alkylresorcinol synthase; CHS, chalcone synthase) (Baerson et al. 2010).

3. Alkylresorcinols in plants

In higher plants, alkylresorcinols typically occur as mixtures of homologues possessing side chains of 13 to 27 carbons with varying degrees of saturation. Fungi and bacteria similarly accumulate mixtures of alkylresorcinols with varying chain lengths; however microbial homologues all possess saturated side chains (Baerson et al. 2010).

The potent antimicrobial activity demonstrated for many naturally occurring alkylresorcinols and alkylresorcinol derivatives in in vitro assays has led to the widely held view that these compounds primarily serve a defensive role in plants (Baerson et al. 2010; Luís et al. 2013).

The highly localized pattern of deposition within regions surrounding specific plant structures coupled with their demonstrated antimicrobial activity, could indicate that these compounds play a role in the formation of defensive chemical barriers. For example, significant accumulation of alkylresorcinols is found within grains of cereals such as wheat, rye, triticale and barley, occurring within a thin cuticle layer external to the seed coat (Baerson et al. 2010; Bondia-Pons et al. 2009; Gliwa et al. 2011; Kozubek 1987; Sampietro et al. 2013).

Significant concentrations of alkylresorcinols have also been found within the cuticles of rye leaves, with similar homolog compositions occurring on the adaxial and abaxial leaf surfaces. Root systems of *Oryza* sp. exude an alkylresorcinol mixture, and likewise, *Sorghum* sp. exudates contain the alkylresorcinol derivative sorgoleone, which is an allelochemical also possessing antifungal activity (Baerson et al. 2010; Bondia-Pons et al. 2009; Gliwa et al. 2011; Kozubek 1987; Sampietro et al. 2013).

The amphiphilic (surfactant-like) characteristics of alkylresorcinols and derivatives, such as sorgoleone, could promote the formation of thin exudate layers completely

covering root systems, thus providing a continuous defensive boundary. This would be analogous to the process described to the leaf trichome exudates of *Lycopersicon* sp., where the formation of continuous antifungal chemical barriers may be facilitated by the presence of amphiphilic acylglucose exudate constituents (Baerson et al. 2010).

4. Biological properties of alkylresorcinols

The interest for new compounds with biological properties has increased in recent years, especially compounds derived from plants, and its secondary metabolites, known as bioactive compounds.

During the search for antineoplastic agents from Panamanian Flora, two new alkylresorcinols 1-(2,6-dihydroxyphenyl)octan-1-one and (+)-1-(3-(1-(2,6-dihydroxyphenyl)butyl)-2,6-dihydroxyphenyl)octan-1-one, were identified from the leaves of *Homalomena wendlandii* Schott (Araceae). (+)-1-(3-(1-(2,6-dihydroxyphenyl)butyl)-2,6-dihydroxyphenyl)octan-1-one exhibited IC_{50} values of 3.3, 5.8 and 4.0 $\mu\text{g/mL}$ against human breast carcinoma (MCF-7), central nervous system carcinoma (SF-268) and lung carcinoma (H-460) cell lines, respectively (Sánchez et al. 2012).

In a similar study of the Madagascar Rainforest, it was possible to isolate ten 5-alkylresorcinols, eight of them new and two already known, from the extract of *Oncostemon bojerianum* (Myrsinaceae). These compounds were tested for cytotoxicity against ovarian cancer cells (A2780). All of these compounds were found to be weakly cytotoxic, with IC_{50} values ranging between 9.4 and 11.4 $\mu\text{g/mL}$ (Chaturvedula et al. 2002). The fact that all the compounds isolated had similar activities suggests that the activity is mainly dependent on the basic skeleton of the 5-alkylresorcinols, rather than

on any specific substituents thereon (Chaturvedula et al. 2002). It is also noteworthy that other researchers have found that 5-alkylresorcinols function as DNA-cleaving agents, and it seems possible that these dialkylresorcinols act in the same way (Barr et al. 1988).

In the continuing search for bioactive molecules from the plants of Taiwan, a methanolic extract of the leaves of *Grevillea robusta* was selected for bioassay-guided fractionation, as it showed significant cytotoxicity against MCF-7, lung carcinoma (NCI-H460), and SF-268 cell lines (Chuang and Wu 2007). By prolonged chromatographic separations on silica gel, small amounts of fourteen pure 5-alkylresorcinols metabolites were isolated. Of these, gravicycle, dehydrogravicycle, bisgravillol, dehydrobisgravillol, dehydrograviphane, and methyldehydrograviphane were new compounds; graviphane and methylgraviphane were isolated as pure compounds for the first time; and robustol, dehydrorobustol A, bis-norstriatol, 5-[14'-(3'',5''-dihydroxyphenyl)-cis-tetradec-6'-en-1-yl]resorcinol, cis-5-n-pentadecylresorcinol, and cis-5-n-pentadec-8'-enylresorcinol were known compounds (Chuang and Wu 2007). All these alkylresorcinols were subjected to cytotoxic evaluation against MCF-7, NCI-H460, and SF-268 cell lines. They all showed marginal cytotoxicity. The similar IC₅₀ values of these compounds allows to conclude that the alkyl chain, either cyclic or straight chain, had no impact on the cytotoxic activity of these alkylresorcinols (Chuang and Wu 2007).

One alkylresorcinol (5-(2-acetoxynonyl)resorcinol) was isolated from the orchid *Phragmipedium calurum* during a screening for anticancer compounds. It was evaluated for antiproliferative activity against multiple human cancer cell lines, and displayed no activity against any of the tested cell lines (Starks et al. 2012).

In another investigation, alkylresorcinols were identified as the major active components in wheat bran identified as being responsible for the inhibition of human colon cancer cell growth (HCT-116 and HT-29) using a bioassay-guided approach (Zhu, Soroka, and Sang 2012). The study of Gliwa, et al. 2011 focuses on each individual fraction of the bran layer instead of the bran layer as a whole. It suggests that rye is a good dietary source of alkylresorcinols, especially in the outer layer of the bran. The amount of alkylresorcinols gives rye its high antioxidant activity, which is greater than that of other cereals, such as triticale and wheat (Gliwa et al. 2011).

It was found that 1,4-benzoquinones and related resorcinol derivatives are potent leukotrienes synthesis inhibitors, with partially submicromolar IC_{50} values (Filosa et al. 2013). The data provides insights related to studies of structure activity relationship for 1,4-benzoquinone and for resorcinol derivatives as 5-lipoxygenase inhibitors (Filosa et al. 2013).

Authors have also investigated the antibacterial properties of 5-alkylresorcinols. The new 5-alkenylresorcinol Sch725681, isolated and identified from the culture of an *Aspergillus* sp., showed inhibitory activity against *Saccharomyces cerevisiae* (PM503) and *Candida albicans* (C43) (Yang et al. 2006). This alkylresorcinol also showed antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, which indicated that this compound does not have a significant selective antimicrobial profile (Yang et al. 2006).

5. Concluding remarks

A number of resorcinols (1,3-dihydroxyalkylbenzenes) have been isolated from natural origins. Many have been described as having antifungal, antimicrobial or cytotoxic properties. This paper aimed to create a comprehensive review on the biological

activities of the most relevant alkylresorcinols and generate interest in deepening the knowledge on this class of compounds, as well as in the subsequent study of their bioactivities and mechanisms of action, both in human cells and in microorganisms.

6. Acknowledgments

Ângelo Luís acknowledges a PhD fellowship from Fundação para a Ciência e a Tecnologia (Reference: SFRH/BD/65238/2009), co-funded by Fundo Social Europeu (POPH – QREN) and by national funds of Ministério da Educação e Ciência. This work was partially supported by the project PEst-C/SAU/UI0709/2011 funded by Fundação para a Ciência e a Tecnologia through the program COMPETE.

7. References

- Baerson, S., Schröder, J., Cook, D., Rimando, A., Pan, Z., Dayan, F., Noonan, B., Duke, D., 2010. Alkylresorcinol biosynthesis in plants: new insights from an ancient enzyme family?. *Plant Signal. Behavior.* 5, 1286–1289.
- Barr, J., Murty, V., Yamaguchi, K., Singh, S., Smith, D., Hecht, S., 1988. 5-Alkylresorcinols from *Hakea amplexicaulis* that cleave DNA. *Chem. Res. Toxicol.* 1, 204–207.
- Bondia-Pons, I., Aura, A., Vuorela, S., Kolehmainen, M., Mykkänen, H., Poutanen, K., 2009. Rye phenolics in nutrition and health. *J. Cereal Sci.* 49, 323–336.
- Chaturvedula, V., Schilling, J., Miller, J., Andriantsiferana, R., Rasamison, V., Kingston, D., 2002. New cytotoxic bis 5-alkylresorcinol derivatives from the leaves of *Oncostemon bojerianum* from the Madagascar Rainforest. *J. Nat. Prod.* 65, 1627–1632.

Chuang, T., Wu, P., 2007. Cytotoxic 5-alkylresorcinol metabolites from the leaves of *Grevillea robusta*. *J. Nat. Prod.* 70, 319–323.

Filosa, R., Peduto, A., Aparoy, P., Schaible, A., Luderer, S., Krauth, V., Petronzi, C., Massa, A., Rosa, M., Reddanna, P., Werz, O., 2013. Discovery and biological evaluation of novel 1,4-benzoquinone and related resorcinol derivatives that inhibit 5-lipoxygenase. *Eur. J. Med. Chem.* 67, 269–279.

Gliwa, J., Gunenc, A., Ames, N., Willmore, W., Hosseinian, F., 2011. Antioxidant activity of alkylresorcinols from rye bran and their protective effects on cell viability of PC-12 AC cells. *J. Agr. Food Chem.* 59, 11473–11482.

Kozubek, A., 1987. The effect of 5-(alk(en)yl)resorcinols on membranes. *Acta Biochim. Pol.* 34, 357–367.

Luís, Â., Cruz, C., Duarte, A. P., Domingues, F., 2013. An alkenylresorcinol derivative from *Hakea sericea* fruits and their antimicrobial activity. *Nat. Prod. Commun.* 8, 1459–1462.

Sampietro, D., Jimenez, C., Belizán, M., Vattuone, M., Catalán, C., 2013. Development and validation of a micromethod for fast quantification of 5-n-alkylresorcinols in grains and whole grain products. *Food Chem.* 141, 3546–3551.

Sánchez, L., Olmedo, D., López-Pérez, José, L., Williams, T., 2012. Two new alkylresorcinols from *Hamalomena wendlandii* and their cytotoxic activity. *Nat. Prod. Commun.* 7, 1043–1046.

Starks, C., Williams, R., Norman, V., Lawrence, J., O'Neil-Johnson, M., Eldridge, G., 2012. Phenylpropanoids from *Phragmipedium calurum* and their antiproliferative activity. *Phytochemistry.* 82, 172–175.

Yang, S., Chan, T., Terracciano, J., Loebenberg, D., Patel, M., Gullo, V., Chu, M., 2006. A new 5-alkenylresorcinol Sch 725681 from *Aspergillus* Sp. *J. Antibio.* 59, 190–192.

Zhu, Y., Soroka, D., Sang, S., 2012. Synthesis and inhibitory activities against colon cancer cell growth and proteasome of alkylresorcinols. *J. Agr. Food Chem.* 60, 8624–8631.

A área florestal portuguesa ocupa cerca de 3.3 milhões de hectares, o que representa cerca de 38% do território nacional. O ecossistema da Serra da Estrela suporta uma vasta cobertura vegetal, constituindo a principal rede ecológica do interior. Neste ecossistema crescem diversas espécies de árvores e arbustos que são potenciais fontes de compostos bioativos [164]. A produção e acumulação de metabolitos secundários nas plantas pode ter várias funções, tais como, auto-proteção, atração de polinizadores, estabelecimento de relações de simbiose e desenvolvimento das estruturas vegetais [153].

A oxidação é um processo essencial para a produção de energia no organismo humano, no entanto as ROS são, por vezes, produzidas em excesso sob condições patológicas, resultando em stresse oxidativo, o qual também pode estar associado a diversas patologias. A oxidação também afeta os produtos alimentares, sendo uma das principais causas de deterioração. No sentido de reduzir estes danos, na indústria são utilizados antioxidantes sintéticos no processamento alimentar, de modo a evitar a oxidação e degradação dos alimentos. No entanto, estes compostos podem ser responsáveis por efeitos colaterais graves, nomeadamente danos hepáticos e carcinogénese [165]. Neste contexto, surge o interesse pela descoberta de novas substâncias antioxidantes, que possam proteger o corpo humano dos radicais livres e atrasar o progresso das várias doenças crónicas associadas e, por outro lado, prevenir a degradação oxidativa dos alimentos. Os antioxidantes naturais ganham assim relevância, por serem mais facilmente aceites pelas pessoas, pela perceção da sua segurança e eficácia [30]. Verifica-se atualmente um aumento de interesse nos compostos bioativos de origem natural, cujas propriedades podem exceder as dos antioxidantes sintéticos, de modo a identificar novos antioxidantes para fins industriais, nomeadamente, para a indústria alimentar, farmacêutica e cosmética. De entre os compostos com atividade antioxidante de origem vegetal, destacam-se os compostos fenólicos [58].

As plantas são normalmente ricas em compostos fenólicos, tais como, flavonoides, ácidos fenólicos, estilbenos, taninos, cumarinas, lignanas, além da lignina, podendo possuir, por isso, múltiplas atividades biológicas, nomeadamente atividade antioxidante. A atividade antioxidante dos compostos fenólicos deve-se às suas propriedades redox, à capacidade de quelar metais de transição e de sequestrar átomos de oxigénio singlete [36]. Outras propriedades biológicas dos compostos fenólicos, tais como, anti-cancerígena, anti-inflamatória, anti-aterogénica, anti-trombótica, imuno-moduladora e analgésica foram também demonstradas [166].

Um dos objetivos deste trabalho foi determinar a concentração de algumas classes de metabolitos secundários (fenóis, flavonoides, taninos e alcaloides) usualmente associados às propriedades biológicas das plantas [167], em extratos metanólicos das partes aéreas de várias espécies arbustivas recolhidas no Parque Natural da Serra da Estrela, e posteriormente, avaliar a atividade antioxidante desses extratos.

Para a determinação quantitativa dos compostos fenólicos nos extratos foi utilizado o método do reagente de Folin-Ciocalteu. Observou-se que os extratos dos caules e das folhas têm maiores concentrações de compostos fenólicos que os extratos das flores e dos frutos. O extrato dos caules de *C. monogyna* é o que tem maior quantidade de fenóis totais (377.4 mg GAE/g matéria seca). Este resultado está de acordo com o previamente descrito para esta espécie [132], [168]. As espécies *I. acuminata* e *R. aculeatus* apresentaram baixas concentrações destes compostos. As espécies *C. multiflorus*, *P. tridentatum* e *E. arborea* têm elevadas concentrações de fenóis. Os frutos de *R. ulmifolius* possuem baixas concentrações de fenóis (54.5 mg GAE/g matéria seca), quando comparados com os caules, folhas e flores da mesma espécie (186.8, 167.6 e 291.4 mg GAE/g matéria seca, respetivamente). Não existem resultados anteriores na literatura acerca da composição química das espécies de *E. ibericum* e *H. sericea*, no entanto verificou-se que estas espécies apresentam quantidades significativas de fenóis totais. Os resultados obtidos para a espécie *J. communis* estão de acordo com o estudo de Öztürk *et al*, 2011 [30] no qual se concluiu que o metanol é o melhor solvente para a extração de compostos bioativos. Quanto à determinação dos taninos, estes foram precipitados com PVPP [18], no entanto não se verificou nenhuma tendência nos teores destes compostos nos extratos ou nas diferentes partes das plantas estudadas.

Os flavonoides são compostos polifenólicos que ocorrem nas plantas, são responsáveis pela pigmentação das flores e dos frutos, e variam na sua estrutura num dos anéis aromáticos, que os caracteriza nos diferentes tipos: flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavononas, flavanóis e antocianinas [36], [47]. Os flavonoides atuam como antioxidantes, uma vez que são facilmente capazes de doar um eletrão ou um átomo de hidrogénio a um radical peroxil ou alcóxil, terminando a reação em cadeia da peroxidação lipídica ou regerando um composto fenólico que efetivamente pode quelar um metal de transição pró-oxidante [47].

A quantificação dos flavonoides fez-se após precipitação dos mesmos com cloreto de alumínio em meio alcalino. O precipitado adquire a coloração amarela, o que permite a medição espectrofotométrica [169]. No geral, os extratos das flores e dos frutos têm mais flavonoides que os extratos dos caules e das folhas. Contudo, a espécie *I. acuminata* é a mais rica nestes compostos, particularmente o extrato das folhas desta espécie (70.0 mg QE/g matéria seca). As espécies *E. arborea*, *C. multiflorus*, *R. ulmifolius* e *P. tridentatum* apresentaram grandes concentrações de flavonoides na sua constituição, o que está de acordo com alguns dados anteriores sobre a caracterização de espécies arbustivas da Serra da Estrela [170]. As espécies *E. ibericum* e *H. sericea* foram pela primeira vez caracterizadas relativamente à sua composição em flavonoides e mostraram ter grandes concentrações destes compostos.

Como na maioria dos casos, as atividades biológicas das plantas, são devidas a vários compostos, que podem atuar em conjunto, havendo sinergismos, potenciação ou efeitos aditivos, a determinação de diversas classes de compostos em extratos vegetais torna-se importante para compreender melhor a bioatividade desses extratos [26]. Por isso, os alcaloides foram também determinados em todos os extratos, recorrendo ao método do

reagente de Dragendorff. Os alcaloides, compostos de baixo peso molecular, são responsáveis pelos efeitos terapêuticos de várias plantas medicinais, no entanto muitos são tóxicos [171]. Verificou-se que todos os extratos possuem alcaloides, sendo a espécie *C. multiflorus* a mais rica nestes compostos, particularmente o extrato dos caules. Esta espécie é conhecida por possuir um alcaloide com propriedades antiarrítmicas, designado por esparteína [128]. O extrato das folhas de *I. acuminata* também é rico em alcaloides, ao contrário da espécie *J. communis*. Como o principal objetivo deste trabalho é estudar as bioatividades dos compostos fenólicos, a determinação dos alcaloides totais teve como único objetivo complementar a caracterização dos extratos nas várias classes de metabolitos secundários.

A determinação laboratorial da atividade antioxidante de extratos de plantas tem algumas limitações, uma vez que depende do método que se utiliza. O mecanismo de atividade antioxidante é muito complexo e depende de vários fatores. Assim, utilizar apenas um método para avaliar a atividade antioxidante de extratos vegetais não é suficiente para permitir tirar conclusões relevantes [52]. Neste sentido, a atividade antioxidante dos extratos foi avaliada usando dois métodos diferentes: o método do DPPH e o sistema β -caroteno/ácido linoleico. Sabe-se que os antioxidantes reagem com o radical livre DPPH (de cor violeta intensa) e o convertem em 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH-H) (de cor amarela). O efeito dos antioxidantes vegetais pode ocorrer pela sua capacidade de doar átomos de hidrogénio ou de redução do radical livre [41]. No sistema β -caroteno/ácido linoleico, é necessária a presença de oxigénio para a oxidação do ácido linoleico e sua conversão em hidroperóxidos lipídicos. Estes compostos, muito reativos, atacam as moléculas altamente insaturadas do β -caroteno, levando à sua descoloração. As substâncias antioxidantes podem inibir este processo de várias formas, nomeadamente, através da decomposição dos peróxidos, parando a reação em cadeia, neutralizando o radical livre de linoleato ou outros radicais livres formados neste sistema [41], [172].

Os resultados do método do DPPH foram apresentados na forma de IC_{50} , que se define como a concentração de amostra necessária para inibir em 50% os radicais de DPPH, isto é, reduzir a sua concentração inicial para metade, nas condições experimentais [45]. Analisando os resultados, verificou-se que as espécies *E. ibericum*, *R. aculeatus* e *I. acuminata* são as que apresentam atividade antioxidante mais fraca. Pelo contrário, o extrato dos caules de *C. monogyna* tem em simultâneo maior atividade antioxidante e maior concentração em fenóis totais. O extrato dos frutos desta espécie tem atividade antioxidante moderada. Todos os extratos das espécies *E. arborea* e *H. sericea* possuem atividade antioxidante muito forte, quando comparada com a rutina e o trolox, por exemplo.

Verificou-se uma correlação linear positiva ($R^2=0.8442$) entre a atividade antioxidante e os fenóis totais dos extratos. Este resultado é indicativo de que os compostos fenólicos deverão ser os responsáveis pelas propriedades antioxidantes dos extratos. Outros investigadores chegaram a semelhantes conclusões [93], [173]. A mesma análise foi feita para os flavonoides e concluiu-se que não existe correlação entre estes compostos e a atividade antioxidante dos

extratos ($R^2=0.0083$). O que significa que a maioria dos flavonoides extraídos não contribui diretamente para a atividade antioxidante dos extratos. Sabe-se que a posição dos grupos hidroxilo nas moléculas dos flavonoides influencia as suas propriedades antioxidantes; que dependem da capacidade de doar átomos de hidrogénio e/ou eletrões ao radical livre [174].

O método de determinação da atividade antioxidante que usa o sistema β -caroteno/ácido linoleico permite medir indiretamente a inibição da peroxidação lipídica pelos extratos. Os extratos de *E. ibericum* apresentaram uma elevada capacidade de inibição da oxidação das moléculas de ácido linoleico e de sequestrar os radicais provenientes da sua oxidação, quando comparados com os extratos das espécies de *P. tridentatum* e *H. sericea*. Em contraste com os resultados do método do DPPH, em que os extratos de *E. ibericum* não apresentaram capacidade significativa de sequestrar os radicais livres de DPPH. A capacidade de inibição da oxidação do ácido linoleico por estes extratos, pode indicar o seu potencial uso como antioxidantes alimentares. Estes resultados mostram a importância de utilizar métodos que avaliam propriedades antioxidantes diferentes nos extratos vegetais. Os extratos das espécies *P. tridentatum* e *I. acuminata* são fracos inibidores da peroxidação lipídica, em contraste com os das espécies *R. ulmifolius* e *J. communis*, e quando comparados com o BHT. No estudo de Oztürk *et al*, 2011 [30], com diferentes espécies de *Juniperus*, concluiu-se que os extratos metanólicos inibiam a oxidação do ácido linoleico, avaliada pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico.

A análise por RP-HPLC permitiu identificar e quantificar nos extratos, os compostos fenólicos principais e que mais comumente se encontram em extratos vegetais. Devido à diversidade e complexidade dos extratos de plantas, é difícil caracterizar cada um dos compostos neles presentes e elucidar a sua estrutura. Contudo, identificar as classes maioritárias dos compostos fenólicos torna-se uma tarefa mais fácil. Com o método usado, conseguiu obter-se a separação satisfatória, e com boa resolução, de nove compostos fenólicos, incluindo ácidos hidroxibenzoicos, ácidos hidroxicinâmicos e flavonoides. O ácido gálico é um dos compostos fenólicos mais importantes, mas nos extratos analisados, este composto está presente em baixas quantidades, apenas 1.26%. No geral, verificou-se que os ácidos hidroxicinâmicos identificados (ácidos cafeico, clorogénico, *p*-cumárico e ferúlico) estão abundantemente presentes. O ácido ferúlico é o ácido hidroxicinâmico dominante, tendo uma percentagem de ocorrência de 29.0%. Resultados semelhantes foram obtidos por outros investigadores para outras amostras vegetais, tais como extratos de várias espécies de citrinos [175]. O ácido elágico e a quercetina também estão presentes em grandes quantidades, com percentagens de ocorrência de 17.9% e 13.7%, respetivamente. No extrato das flores de *P. tridentatum*, o ácido vanílico é o composto maioritário, tendo uma concentração de 32.2mg/g matéria seca, o que corresponde a 27.6% de ocorrência. Cerca de 34.5% dos fenóis identificados no extrato das folhas de *R. ulmifolius* correspondem ao ácido ferúlico, com uma concentração de 18.5mg/g matéria seca. Nos frutos do mesmo arbusto, o ácido clorogénico é o composto maioritário. A espécie *C. multiflorus* é rica nos ácidos ferúlico e elágico, particularmente as

folhas, flores e frutos. O extrato dos caules de *E. arborea* possui grande concentração de ácido ferúlico, enquanto o extrato das flores da mesma espécie é rico em ácido elágico. As flores de *C. monogyna* são ricas em ácido ferúlico (116.8mg/g matéria seca, 75.7% de percentagem de ocorrência, relativamente aos fenóis quantificados neste extrato).

As espécies exóticas invasoras causam problemas sócio-ecológicos, como mudanças na composição e função dos ecossistemas, podendo levar à perda da biodiversidade característica dos habitats naturais. A espécie *A. altissima* é um exemplo de uma planta exótica e invasora em diversos países, incluindo Portugal [176]. Esta espécie é nativa da China e foi introduzida na Europa no século XVIII. Estudos fitoquímicos prévios, de outros autores, demonstraram a presença de quassinoides e de alcaloides indólicos nesta planta. Os lípidos, ácidos gordos, derivados fenólicos e os compostos voláteis das folhas de *A. altissima* também foram caracterizados, mostrando propriedades medicinais [153], [160]. Deste modo, decidiu fazer-se um estudo exaustivo sobre os extratos etanólicos, metanólicos, em acetona e hidroalcoólicos das partes aéreas desta espécie, caracterizando-se diferentes classes de metabolitos secundários e também a sua atividade antioxidante, por forma a aprofundar o estudo desta planta.

Verificou-se que os extratos das folhas possuem grandes concentrações de fenóis totais (> 130 mg GAE/g matéria seca). Os extratos hidroalcoólicos são os que possuem mais fenóis totais, indicando que, neste caso, a mistura água/etanol foi o melhor solvente para a extração destes compostos. Contudo, como o reagente de Folin-Ciocalteu também pode reagir com outras substâncias redutoras de origem não-fenólica, como por exemplo os açúcares redutores, que são facilmente extraídos com água, a quantificação dos fenóis totais nos extratos hidroalcoólicos pode estar sobrevalorizada. Verificou-se também que o extrato em acetona das folhas de *A. altissima* é o que tem mais fenóis e pelo contrário o extrato metanólico dos talos da mesma espécie é o mais pobre nestes compostos. Todos os extratos de *A. altissima* apresentaram grandes concentrações de alcaloides, particularmente o extrato em acetona dos talos, o que está de acordo com outros estudos sobre esta planta [153].

Os extratos hidroalcoólicos exibiram melhores propriedades antioxidantes, pelo método do DPPH, o que indica que esta mistura de solventes, é a melhor, para a extração de substâncias com atividade antioxidante, nomeadamente compostos fenólicos, o que pode confirmar que este extrato tem mesmo uma elevada concentração em fenóis totais, não estando por isso sobrevalorizada pelo método do reagente de Folin-Ciocalteu. Rahman *et al*, 2009 [159], no seu estudo sobre esta espécie, também concluiu que os extratos das folhas de *A. altissima* possuem elevadas concentrações de fenóis totais e exibem propriedades antioxidantes acentuadas [159]. Os extratos de *A. altissima* podem ser uma alternativa aos antioxidantes sintéticos utilizados na indústria como conservantes no processamento alimentar, uma vez que possuem elevadas percentagens de inibição da oxidação das moléculas de ácido linoleico, o que sugere a capacidade de inibição da peroxidação lipídica.

Verificou-se novamente, uma correlação linear positiva entre a atividade antioxidante e os compostos fenólicos presentes nos extratos ($R^2=0.9593$), ao contrário do que se verificou com os flavonoides ($R^2=0.2901$). Através da análise por RP-HPLC dos extratos desta espécie, concluiu-se que na composição em fenóis das diferentes partes aéreas de *A. altissima*, o ácido ferúlico é o mais abundante, com 25.29% de percentagem de ocorrência.

O aumento dos microrganismos resistentes aos antibióticos, que se tem verificado nos últimos anos, levou ao acréscimo no interesse pela descoberta de novas substâncias com atividade anti-microbiana [68]. No geral, observa-se o aumento da resistência das bactérias e fungos patogénicos aos antibióticos conhecidos [177]. Além disso, as bactérias que aderem a dispositivos médicos ou a tecidos danificados são uma das causas de infeções persistentes. Estas bactérias envolvem-se numa matriz hidratada de polissacáridos e proteínas, formando uma camada viscosa, conhecida como biofilme [66]. Este mecanismo aumenta a resistência aos antibióticos e microbicidas e dificulta a erradicação dos microrganismos. Para ultrapassar as desvantagens dos atuais fármacos anti-microbianos, tem-se procurado encontrar novas substâncias com propriedades anti-microbianas e novos modos de ação [177].

As plantas constituem uma fonte alternativa de compostos que podem ter tais propriedades, e têm vindo a ser exploradas nesse sentido, nomeadamente no estudo da atividade anti-microbiana dos metabolitos secundários [178], [179]. Assim sendo, outro dos objetivos deste trabalho foi estudar a atividade anti-microbiana dos extratos das espécies vegetais.

Da análise dos resultados da atividade anti-microbiana, obtidos pelo método da difusão em disco, verificou-se que os extratos metanólicos da espécie *H. sericea*, foram os que apresentaram melhor atividade. Esta espécie também é exótica e invasora, de origem Australiana, e foi introduzida em Portugal por razões ornamentais [124]. Avaliou-se a atividade dos extratos metanólicos desta espécie contra diversos microrganismos, incluindo bactérias Gram-positivas, bactérias Gram-negativas e leveduras; além disso a sua atividade anti-biofilme e as propriedades citotóxicas dos extratos foram também estudadas.

Com os resultados obtidos para a difusão em disco, verificou-se que as espécies de *Candida* e de bactérias Gram-negativas não eram inibidas pelos extratos de *H. sericea*. No geral as bactérias Gram-positivas foram mais suscetíveis à ação dos extratos analisados. Também foram determinados os valores de MIC pelo método da diluição em agar e concluiu-se que as bactérias Gram-positivas têm menores valores de MIC que as Gram-negativas, indicando maior suscetibilidade destas bactérias à ação dos extratos de *H. sericea*. Esta diferença de suscetibilidade entre bactérias está relacionada com a membrana externa das bactérias Gram-negativas que torna a superfície bacteriana muito hidrofílica, atuando como barreira de permeabilidade [180]. As diferenças morfológicas entre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas podem justificar as diferenças na sensibilidade aos anti-microbianos, porque as bactérias Gram-negativas possuem a membrana externa constituída por fosfolípidos e por componentes estruturais de lipopolissacáridos, o que não se verifica nas bactérias Gram-positivas. Isto torna a parede celular impermeável a solutos lipofílicos, enquanto as porinas

constituem uma barreira a solutos hidrofílicos com um limite de exclusão de cerca de 600Da [181]. Outra explicação para que as bactérias Gram-positivas sejam mais suscetíveis aos antimicrobianos pode ser porque o composto em estudo atue pela inibição da síntese do peptidoglicano [181].

Os valores de MIC dos extratos de *H. sericea* para as bactérias Gram-positivas variaram entre 0.04 e 0.625mg/mL. O extrato dos frutos foi o que apresentou valores de MIC menores para várias espécies de microrganismos, nomeadamente, *S. aureus*, *B. cereus*, *L. monocytogenes* e para os isolados clínicos MRSA 10/08 e MRSA 12/08, o que indica um elevado potencial antimicrobiano.

Como os extratos de *H. sericea* apresentaram baixos valores de MIC para todas as estirpes de *S. aureus*, decidiu avaliar-se a atividade destes extratos na formação de biofilmes dessas estirpes, uma vez que estes microrganismos têm a capacidade de formar biofilmes em dispositivos médicos e em tecidos danificados, tornando-os difíceis de erradicar [182]. Verificou-se que os extratos de *H. sericea* inibiram a formação de biofilmes de todas as estirpes de *S. aureus*. No geral, a inibição da formação de biofilmes de *S. aureus* deveu-se à inibição do crescimento das bactérias ou à morte das mesmas. No entanto para concentrações sub-MIC a formação de biofilmes também foi inibida. O extrato dos frutos (2.5mg/mL) erradica por completo os biofilmes da estirpe MRSA 12/08.

Como os extratos de *H. sericea* apresentaram propriedades antioxidantes, anti-microbianas e anti-biofilme, e considerando a sua futura aplicação para fins médicos e/ou industriais, fizeram-se estudos de citotoxicidade. Para avaliar a citotoxicidade destes extratos começou por se fazer o teste de hemólise, uma vez que a membrana dos eritrócitos é um bom indicador do efeito que os compostos podem ter na sua estrutura física [183]. Verificou-se que apenas ocorre hemólise, para concentrações de extrato muito superiores às bioativas, o que indica que os extratos apresentam baixa citotoxicidade. As propriedades citotóxicas dos extratos foram ainda avaliadas pelo ensaio do MTT. O MTT é um composto amarelo solúvel em água, que quando reduzido pelas desidrogenases mitocondriais das células viáveis, é convertido em cristais púrpura insolúveis [184]. Os resultados mais interessantes e promissores foram obtidos para o extrato dos frutos de *H. sericea*, que não apresentou toxicidade para as células NHDF, uma vez que não alterava a sua viabilidade, mas reduzia a viabilidade da linha de células cancerígenas MCF-7 em cerca de 60%, o que sugere a atividade anticancerígena deste extrato, pois apresenta toxicidade seletiva.

Perante a obtenção de diversas atividades biológicas e baixa citotoxicidade, para a espécie *H. sericea*, e de um modo particular a bioatividade do extrato dos frutos desta espécie, decidiu fazer-se o fracionamento bioguiado deste extrato, por cromatografia em coluna, usando sílica-gel como fase estacionária, e um gradiente de solventes com polaridade crescente, de modo a obter frações o mais puras possível, de forma a conseguir a identificação estrutural do(s) composto(s) bioativo(s). A eluição da cromatografia foi sucessivamente acompanhada por TLC; os cromatogramas foram revelados através do reagente de Folin-Ciocalteu

(pesquisando compostos fenólicos), de uma solução de cloreto de alumínio (para flavonoides) e de uma solução de DPPH (compostos antioxidantes). Além disso, usou-se a técnica da bioautografia direta para avaliar a atividade anti-microbiana das frações, diretamente a partir dos TLC. Nesta técnica, os TLC são imersos numa suspensão celular bacteriana, e após incubação, as zonas de inibição do crescimento são visualizadas utilizando um corante vital (MTT) [185]. Observando os cromatogramas, foi possível verificar que algumas frações tinham propriedades anti-microbianas contra estirpes de *S. aureus*.

Posteriormente, os valores de MIC das frações foram determinados usando o método da resazurina, que é um corante azul, que permite a detecção de crescimento microbiano mesmo em pequenos volumes de amostra [186]. Verificou-se que os valores de MIC de algumas frações são menores que os do extrato bruto. As frações 4, 6 e 9, por serem as que se apresentavam mais puras e com menores valores de MIC, nomeadamente para as estirpes de *S. aureus*, foram analisadas por NMR, FTIR e HRMS, por forma a elucidar a estrutura química do composto responsável pelas atividades biológicas. Após o fracionamento bioguiado do extrato bruto, concluiu-se que apenas um composto maioritário estava presente naquelas frações.

O espectro de infravermelho apresentou ampla absorção a $3550-3200$ e 1710cm^{-1} , indicando a presença de grupos hidroxilo e carbonilo, respetivamente. A espectrometria de massa do composto revelou o íão molecular com a razão m/z de 278.151, correspondendo à fórmula molecular: $\text{C}_{16}\text{H}_{22}\text{O}_4$. Depois de conjugada a informação anterior com toda a informação proveniente das diversas experiências de NMR efetuadas (1D e 2D), concluiu-se que o composto bioativo maioritário que está presente no extrato dos frutos da espécie *H. sericea*, é um derivado da família dos resorcinóis, nunca previamente descrito, designado por ácido 9-(3,5-dihidroxi-4-metilfenil)nona-3-(Z)-enóico. O estudo de Barr *et al*, 1988 [125], com espécies da família *Hakea*, levou ao isolamento e identificação de outros resorcinóis com capacidade de clivagem de moléculas de DNA. Algumas propriedades biológicas de resorcinóis isolados de plantas já descritas incluem: propriedades citotóxicas, anticancerígenas, anti-proliferativas, anti-leishmaniose e antioxidantes [187]-[192].

Na fase seguinte deste trabalho, demonstrou-se a atividade anti-microbiana do novo resorcinol contra várias espécies de microrganismos, utilizando o método da resazurina. Verificou-se que o composto atua mais eficazmente em bactérias Gram-positivas, com valores de MIC de 0.31, 0.16 e 0.02mg/mL para as bactérias *E. faecalis*, *L. monocytogenes* e *B. cereus*, respetivamente. Para as estirpes de *S. aureus*, incluindo os isolados clínicos resistentes, obtiveram-se bons valores de MIC (0.005-0.16mg/mL).

Na sequência do trabalho que tinha sido desenvolvido com os extratos vegetais e como estudo complementar, estudos preliminares sobre a atividade anti-microbiana dos compostos puros, que foram identificados por RP-HPLC nos extratos das plantas, mostraram a grande atividade dos ácidos gálico, cafeico e clorogénico em estirpes de *S. aureus*. Neste sentido, decidiu explorar-se esta atividade, avaliando a ação destes três ácidos fenólicos em células

planctônicas e em biofilmes de *S. aureus*. Verificou-se que o ácido gálico é aquele que tem maior atividade, apresentando o menor valor de MIC (4×10^{-3} mg/mL) para todas as estirpes de *S. aureus*. Os fitoquímicos são classificados como anti-microbianos quando os valores de MIC se encontram entre 0.1 e 1 mg/mL [193]. Logo, os ácidos fenólicos estudados, podem efetivamente ser classificados como anti-microbianos, uma vez que os seus valores de MIC se encontram entre $4-500 \times 10^{-3}$ mg/mL para as estirpes de *S. aureus* estudadas. Para se perceber de que forma estes compostos fenólicos exercem o seu efeito nas células de *S. aureus*, estudou-se o seu mecanismo de ação usando o teste da prolina e através de citometria de fluxo. O teste da prolina baseia-se no facto dos fenóis poderem comportar-se como análogos da prolina, inibindo a sua oxidação, via desidrogenase da prolina [194]. Se a desidrogenase da prolina for inibida pelos fenóis, o metabolismo energético das células bacterianas ficará comprometido. Portanto, a adição de prolina superará os efeitos da inibição da enzima pelos fenóis [194]. Através da aplicação deste método, verificou-se que o ácido gálico atuava na inibição da desidrogenase da prolina, uma vez que a presença de prolina no meio de cultura revertia os efeitos inibitórios deste composto contra as estirpes de *S. aureus*.

A citometria de fluxo foi utilizada no sentido de se elucidar o mecanismo de ação dos compostos. Avaliou-se a integridade da membrana, o potencial de membrana, o efluxo e a atividade metabólica das células. A estirpe *S. aureus* ATCC 25923 foi tratada com ácido cafeico e a estirpe MRSA 10/08 tratada com ácido gálico. Esta escolha de combinações de estirpe e composto foi baseada nos resultados obtidos nos ensaios de curvas de morte, nos quais se concluiu que existia um efeito bacteriostático em ambos os casos. Foram escolhidos quatro fluorocromos (PI, BOX, EB e CTC) para se efetuar a marcação das células bacterianas. O PI foi usado para avaliar a integridade da membrana, uma vez que se esta estiver comprometida, o PI entra nas células, onde se liga aos ácidos nucleicos [195]. O fluorocromo BOX utilizou-se para avaliar o potencial de membrana, uma vez que as células despolarizadas acumulam BOX no seu interior [195]. O efluxo foi estudado usando o EB e a atividade metabólica usando o CTC. Nas células bacterianas viáveis o CTC é reduzido, resultando na produção de cristais insolúveis fluorescentes de CTC-formazano [195].

No caso da estirpe *S. aureus* ATCC 25923, o ácido cafeico aumentou a permeabilidade da membrana, despolarizou a membrana e reduziu a atividade metabólica. Após o tratamento com $2 \times \text{MIC}$ do ácido cafeico, a percentagem de células PI-positivas foi de 11.63%, valor superior ao tratamento com $0 \times \text{MIC}$ (2.98%) e com $1 \times \text{MIC}$ (2.86%), o que indica que o ácido cafeico causa danos na integridade da membrana das células da estirpe *S. aureus* ATCC 25923. Além disso, a percentagem de células despolarizadas (BOX-positivas) foi superior na presença do ácido cafeico, o que sugere que o composto causa a despolarização da membrana. Após incubação com ácido cafeico, a percentagem de células capazes de reduzirem o CTC diminuiu drasticamente. Com $2 \times \text{MIC}$, a atividade metabólica foi cerca de metade do valor obtido para $0 \times \text{MIC}$, indicando que a viabilidade das células está significativamente comprometida. Relativamente ao efluxo, este encontra-se diminuído na

presença do ácido cafeico. Globalmente, analisando a correlação entre a perda do potencial de membrana, o aumento da permeabilidade da membrana e a diminuição da atividade metabólica, concluiu-se que o ácido cafeico inibiu o crescimento da estirpe de *S. aureus* ATCC 25923 pela ruptura da membrana, comprometendo deste modo as suas funções.

Quanto à estirpe MRSA 10/08, o ácido gálico parece não causar danos na membrana das bactérias, uma vez que as células PI- e BOX-positivas não aumentaram após o tratamento com este composto. Contudo, a atividade metabólica e o efluxo são afetados após o tratamento com 1×MIC e 2×MIC do composto. Como o tratamento com ácido gálico, diminuiu a viabilidade das células da estirpe MRSA 10/08 acima dos 95%, concluiu-se que a perda da viabilidade não se deve aos danos da membrana, mas provavelmente a outros alvos em que o ácido gálico atua nas células, como por exemplo na inibição da síntese de ácidos nucleicos e/ou proteínas.

Como os resultados obtidos para células planctônicas mostraram uma atividade de inibição do crescimento das várias estirpes de *S. aureus* e como estes microrganismos são conhecidos formadores de biofilmes, decidiu estudar-se a sua atividade na inibição da formação de biofilmes e nos biofilmes pré-formados das estirpes em estudo. Para tal quantificou-se a biomassa total do biofilme pelo método do violeta de cristal e avaliou-se a atividade metabólica dos biofilmes através do método do XTT. Verificou-se que o ácido gálico (4mg/mL) reduz a formação de biofilmes em 40%, e os ácidos cafeico e clorogénico em cerca de 80%. Estes ácidos foram os mais eficazes na redução da biomassa dos biofilmes pré-formados. Verificou-se ainda que os compostos afetaram a atividade metabólica das células do biofilme, em todas as estirpes de *S. aureus*, no entanto a estirpe ATCC foi mais suscetível do que as estirpes de MRSA. A morfologia dos biofilmes foi visualizada através de Microscopia Eletrónica de Varrimento (SEM). Observou-se, que para a estirpe de *S. aureus* ATCC 25923, a estrutura tridimensional do biofilme era destruída na presença dos compostos fenólicos (4mg/mL); o biofilme formado era escasso e composto por apenas uma camada de células. Além disso, na presença dos compostos fenólicos, observaram-se danos nas paredes das bactérias, o que, por vezes, levou à perda do arranjo característico dos estafilococos.

O processo de formação de biofilmes tem início na adesão das bactérias às superfícies. A adesão é um processo complexo e que é afetado por diversos fatores, nomeadamente pelas características físico-químicas das bactérias, pelas propriedades da superfície do material e pelos fatores ambientais envolventes [193], [196]. Para completar o estudo do efeito dos três ácidos fenólicos nos biofilmes de *S. aureus*, determinou-se a Energia de Adesão das bactérias ao polistireno, após cultura na presença dos compostos. A Energia de Adesão foi determinada através da abordagem termodinâmica de Lifshitz-van der Waals/Interações ácido-base, medindo os ângulos de contacto. Concluiu-se que todas as estirpes de *S. aureus* têm capacidade termodinâmica teórica para aderirem ao polistireno ($\Delta G_{\text{Adesão}}^{\text{Total}} < 0$) e assim formarem biofilmes. Quando expostas aos compostos fenólicos, a energia de adesão para todas as estirpes diminuiu, exceto no caso do tratamento com ácido gálico da estirpe MRSA 12/08 em que esta energia aumentou, o que indica que o ácido gálico diminuiu a capacidade

das bactérias MRSA 12/08 aderirem ao polistireno. O ataque nucleofílico dos fenóis na parede das bactérias resulta em diferentes efeitos na capacidade das bactérias aderirem ao polistireno, tal como descrito previamente por Borges *et al*, 2012 [193].

Como se demonstraram as propriedades inibitórias dos três ácidos fenólicos quer em células planctónicas, quer em biofilmes de *S. aureus*, e como a α -hemolisina é um dos principais fatores de virulência produzidos por estas bactérias, decidi determinar-se a inibição da produção das mesmas pelos compostos. As α -hemolisinas têm atividade hemolítica em eritrócitos, particularmente em eritrócitos de coelho, por isso utilizou-se o teste da hemólise para verificar o efeito dos compostos na atividade hemolítica dos sobrenadantes de culturas bacterianas. Verificou-se que o tratamento com concentrações sub-inibitórias dos compostos, diminuía a atividade hemolítica, o que indica que a produção de α -hemolisinas era inibida pelos compostos, à exceção do ácido clorogénico.

Tendo-se demonstrado as propriedades bioativas dos ácidos gálico, cafeico e clorogénico, descritas anteriormente, e prevendo a sua potencial utilização para fins médicos, na prevenção, controlo e erradicação de biofilmes de *S. aureus*, estes compostos não devem ser tóxicos. Deste modo procedeu-se ao teste da hemólise, tal como se fez nos extratos da espécie *H. sericea*. Verificou-se que para as concentrações bioativas dos compostos, não há hemólise, o que sugere a baixa toxicidade dos três ácidos fenólicos.

No geral, este trabalho contribuiu para o melhor conhecimento das propriedades biológicas de algumas espécies vegetais existentes na região da Serra da Estrela, algumas das quais infestantes, nomeadamente a espécie *A. altissima* que apresentou elevada atividade antioxidante e a espécie *H. sericea* que mostrou potencial atividade anti-microbiana. Foi ainda possível isolar e identificar o ácido 9-(3,5-dihidroxi-4-metilfenil)nona-3-(Z)-enóico do extrato metanólico dos frutos de *H. sericea*, composto que foi pela primeira vez descrito neste trabalho e cujas propriedades anti-microbianas foram também demonstradas. Este estudo indicia que algumas plantas da flora da Serra da Estrela sejam uma importante fonte de compostos bioativos que poderão ser utilizados como alternativas aos antioxidantes sintéticos, que se utilizam na indústria alimentar, e aos anti-microbianos convencionais, e pode ser a base de futuras investigações no sentido de valorizar economicamente esta biomassa florestal, tendo em conta as aplicações descritas. A realização deste trabalho permitiu ainda demonstrar a atividade anti-microbiana dos ácidos gálico, cafeico e clorogénico, em células planctónicas e em biofilmes de *S. aureus*, o que evidenciou as elevadas potencialidades da utilização destes compostos, por exemplo na formulação de desinfetantes ou outros produtos que ajudem a prevenir, controlar ou erradicar os biofilmes de *S. aureus*.

- As espécies vegetais (*E. ibericum*, *P. tridentatum*, *J. communis*, *R. aculeatus*, *R. ulmifolius*, *H. sericea*, *C. multiflorus*, *C. monogyna*, *E. arborea*, *I. acuminata* e *A. altissima*) foram caracterizadas no que respeita a algumas classes de metabolitos secundários, nomeadamente fenóis, flavonoides, taninos e alcaloides. Geralmente, os extratos dos caules e das folhas possuem maiores quantidades de fenóis; no caso dos flavonoides, os extratos das flores e dos frutos são os mais ricos nestes compostos. A espécie *C. multiflorus* foi a que apresentou maior quantidade de alcaloides, particularmente o extrato dos caules;
- A atividade antioxidante de todas as plantas foi avaliada pelo método do DPPH e pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico. A espécie *H. sericea* apresentou grande concentração em fenóis e simultaneamente atividade antioxidante muito forte. Todos os extratos estudados apresentaram capacidade de inibição da oxidação do ácido linoleico. Como se verificou uma correlação linear positiva ($R^2=0.8442$) entre os fenóis totais e a atividade antioxidante de todos os extratos, concluiu-se que estes compostos são os principais responsáveis por esta atividade;
- A espécie *A. altissima* é uma potencial fonte de compostos bioativos com atividade antioxidante, nomeadamente compostos fenólicos e flavonoides. Esta espécie também é rica em alcaloides. Os extratos das folhas de *A. altissima* possuem maiores concentrações de fenóis do que as outras partes aéreas desta planta. A mistura água/etanol foi, neste caso, o solvente mais indicado para a extração de substâncias com atividade antioxidante. Verificou-se uma correlação linear positiva entre a atividade antioxidante e o conteúdo em fenóis totais nos extratos de *A. altissima*. A análise por RP-HPLC mostrou que ácido ferúlico é o ácido hidroxicinâmico dominante nesta planta, com uma percentagem de ocorrência de 25.59%, relativamente aos restantes fenóis identificados;
- A espécie *H. sericea* constitui uma potencial fonte de compostos bioativos com atividade anti-microbiana, nomeadamente contra estirpes de *S. aureus*, incluindo isolados clínicos de MRSA. Demonstrou-se a atividade inibitória dos extratos de *H. sericea*, na formação de biofilmes de *S. aureus*. No geral, os extratos de *H. sericea*, nas concentrações bioativas (0.5 a 5 mg/mL), não apresentaram propriedades tóxicas em eritrócitos humanos. Os extratos dos frutos e das folhas apresentaram toxicidade seletiva, reduzindo a viabilidade das células cancerígenas MCF-7, indicando potenciais propriedades anti-cancerígenas;
- Foi isolado e caracterizado um novo derivado alquenilresorcinol (ácido 9-(3,5-dihidroxi-4-metilfenil)nona-3(Z)-enóico), a partir do extrato metanólico dos frutos da espécie *H. sericea*. A atividade anti-microbiana deste composto foi demonstrada em bactérias Gram-positivas, nomeadamente estirpes de *S. aureus* e MRSA. A

bioatividade do extrato dos frutos de *H. sericea*, particularmente as suas propriedades anti-microbianas e citotóxicas são provavelmente devidas à presença deste composto, pela primeira vez descrito;

- Foram identificados os compostos fenólicos maioritários presentes nos extratos por RP-HPLC. Demonstrou-se a bioatividade benéfica de três desses compostos (ácidos gálico, cafeico e clorogénico) em células planctónicas e em biofilmes de estirpes de *S. aureus*. Além disso, o mecanismo de ação destes compostos fenólicos nas células de *S. aureus* foi elucidado, permitindo a sua possível aplicação como anti-microbianos. Os resultados descritos para estes compostos representam a base para a sua potencial utilização em aplicações alimentares e/ou terapêuticas;
- Face ao exposto anteriormente, este trabalho, contribuiu para o melhor conhecimento das propriedades biológicas de diferentes espécies vegetais que ocorrem na Serra da Estrela, valorizando algumas para as quais não é conhecida nenhuma aplicação na medicina tradicional, nomeadamente *E. ibericum* e *H. sericea*. Por outro lado, permitiu isolar um novo alquenilresorcinol de uma espécie invasora, permitindo deste modo valorizar a biomassa florestal e contribuir para o desenvolvimento de um novo fármaco com base nas propriedades biológicas estudadas. Provou-se também a bioatividade de alguns compostos fenólicos naturais (ácidos gálico, cafeico e clorogénico).

Como perspectivas futuras e no seguimento dos estudos já realizados, o trabalho a desenvolver poderá incluir os seguintes aspetos:

- Aplicar a outras espécies vegetais, para as quais os resultados da atividade antioxidante e anti-microbiana foram mais promissores, nomeadamente, as espécies *J. communis*, *C. monogyna*, *C. multiflorus* ou *A. altissima*, o mesmo tipo de abordagem que se empregou para a espécie *H. sericea*; aprofundando, deste modo, o estudo sobre as suas propriedades anti-microbianas e citotóxicas, o que posteriormente se poderá traduzir no isolamento e identificação de compostos bioativos nesses extratos;
- Estudar o mecanismo de ação do alquenilresorcinol, isolado e identificado neste trabalho, em bactérias Gram-positivas, por citometria de fluxo; identificando o alvo nas células bacterianas em que o composto atua;
- Aprofundar o estudo sobre as propriedades anti-tumorais do novo alquenilresorcinol (ácido 9-(3,5-dihidroxi-4-metilfenil)nona-3(Z)-enóico);
- Estudar a possibilidade de existirem sinergismos entre as combinações possíveis dos ácidos fenólicos estudados (ácidos gálico, cafeico e clorogénico), quer em células planctónicas, quer em biofilmes;
- Avaliar o efeito dos ácidos gálico, cafeico e clorogénico na capacidade de adesão de *S. aureus* a outras superfícies, nomeadamente, aço inoxidável, alumínio e cateteres.

- [1] A. Lubbe, R. Verpoorte, "Cultivation of medicinal and aromatic plants for specialty industrial materials," *Ind. Crops Prod.*, 34, 1, 785-801, 2011;
- [2] A. Goes, *Boletim Estatístico da Indústria Papeleira*, CELPA - As. Lisboa, 2009;
- [3] O. Kaisoon, S. Siriamornpun, N. Weerapreeyakul, N. Meeso, "Phenolic compounds and antioxidant activities of edible flowers from Thailand," *J. Funct. Foods*, 3, 2, 88-99, 2011;
- [4] C. Cueva, M. V. Moreno-Arribas, P. J. Martín-Alvarez, G. Bills, M. F. Vicente, A. Basilio, C. L. Rivas, T. Requena, J. M. Rodríguez, B. Bartolomé, "Antimicrobial activity of phenolic acids against commensal, probiotic and pathogenic bacteria," *Res. Microbiol.*, 161, 5, 372-382, 2010;
- [5] J. Azmir, I. S. M. Zaidul, M. M. Rahman, K. M. Sharif, A. Mohamed, F. Sahena, M. H. A. Jahurul, K. Ghafoor, N. A. N. Norulaini, A. K. M. Omar, "Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review," *J. Food Eng.*, 117, 4, 426-436, 2013;
- [6] L. Rubió, M.-J. Motilva, M.-P. Romero, "Recent advances in biologically active compounds in herbs and spices: a review of the most effective antioxidant and anti-inflammatory active principles," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 53, 9, 943-953, 2013;
- [7] G. M. Cragg, D. J. Newman, "Natural products: A continuing source of novel drug leads," *Biochim. Biophys. Acta*, 1830, 6, 3670-3695, 2013;
- [8] B. S. Patil, G. K. Jayaprakasha, K. N. Chidambara Murthy, A. Vikram, "Bioactive compounds: historical perspectives, opportunities, and challenges," *J. Agric. Food Chem.*, 57, 18, 8142-8160, 2009;
- [9] W. Evans, *Pharmacognosy*, Fifteenth. China: Elsevier, 2002;
- [10] J. Bruneton, *Pharmacognosie, phytochimie, plantes médicinales*, 3 Édition. Paris: Éditions Tec & Doc, 1999;
- [11] M. A. Azad, G. D. Wright, "Determining the mode of action of bioactive compounds," *Bioorg. Med. Chem.*, 20, 1929-1939, 2012;
- [12] O. Santana-Méridas, A. González-Coloma, R. Sánchez-Vioque, "Agricultural residues as a source of bioactive natural products," *Phytochem. Rev.*, 11, 447-466, 2012;
- [13] D. Sarkar and K. Shetty, "Metabolic Stimulation of Plant Phenolics for Food Preservation and Health," *Annu. Rev. Food Sci. Technol.*, 5, 1, 2013;
- [14] "Metabolitos Secundários de Plantas." [Online]. Disponível em: http://es.wikipedia.org/wiki/Metabolitos_secundarios_de_las_plantas. [Acedido a 20-Jan-2014];
- [15] O. Lowry, N. Rosebrough, A. Farr, R. Randall, "Protein measurement with the Folin Phenol Reagent," *J. Biol. Chem.*, 193, 265-267, 1951;
- [16] C. M. D. M. Sousa, H. Rocha, G. M. Vieira-jr, M. C. C. Ayres, L. S. Costa, D. S. Araújo, L. C. D. Cavalcante, E. D. S. Barros, P. B. De M, M. S. Brandão, M. H. Chaves, "Fenóis

Capítulo 6 - Referências Bibliográficas

- Totais e Atividade Antioxidante de cinco Plantas Medicinais,” *Quim. Nova*, 30, 2, 351-355, 2007;
- [17] N. Cicco, M. T. Lanorte, M. Paraggio, M. Viggiano, V. Lattanzio, “A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts,” *Microchem. J.*, 91, 1, 107-110, 2009;
- [18] D. M. S. S. Vitti, A. L. Abdalla, I. C. S. Bueno, J. C. S. Filho, C. Costa, M. S. Bueno, E. F. Nozella, C. Longo, E. Q. Vieira, S. L. S. C. Filho, P. B. Godoy, I. Mueller-Harvey, “Do all tannins have similar nutritional effects? A comparison of three Brazilian fodder legumes,” *Anim. Feed Sci. Technol.*, 119, 3-4, 345-361, 2005;
- [19] W. Aidi Wannes, B. Mhamdi, J. Sriti, M. Ben Jemia, O. Ouchikh, G. Hamdaoui, M. E. Kchouk, B. Marzouk, “Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower,” *Food Chem. Toxicol.*, 48, 5, 1362-1370, 2010;
- [20] C. D. K. Rubanza, M. N. Shem, R. Otsyina, S. S. Bakengesa, T. Ichinohe, T. Fujihara, “Polyphenolics and tannins effect on in vitro digestibility of selected *Acacia* species leaves,” *Anim. Feed Sci. Technol.*, 119, 1-2, 129-142, 2005;
- [21] M. Marcucci, R. Woisky, A. Salatino, “Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis,” *J. Apic. Res.*, 2008;
- [22] N. Hayder, I. Skandrani, S. Kilani, I. Bouhleb, A. Abdelwahed, R. Ben Ammar, A. Mahmoud, K. Ghedira, L. Chekir-Ghedira, “Antimutagenic activity of *Myrtus communis* L. using the *Salmonella* microsome assay,” *South African J. Bot.*, 74, 1, 121-125, 2008;
- [23] S. Sreeja, S. Sreeja, “An in vitro study on antiproliferative and antiestrogenic effects of *Boerhaavia diffusa* L. extracts,” *J. Ethnopharmacol.*, 126, 2, 221-225, 2009;
- [24] M. J. Simirgiotis, “Antioxidant capacity and HPLC-DAD-MS profiling of Chilean peumo (*Cryptocarya alba*) fruits and comparison with German peumo (*Crataegus monogyna*) from southern Chile,” *Molecules*, 18, 2, 2061-2080, 2013;
- [25] N. Orhan, I. E. Orhan, F. Ergun, “Insights into cholinesterase inhibitory and antioxidant activities of five *Juniperus* species,” *Food Chem. Toxicol.*, 49, 9, 2305-2312, 2011;
- [26] N. Sreevidya, S. Mehrotra, “Spectrophotometric Method for Estimation of Alkaloids Precipitable with Dragendorff’s Reagent in Plant Materials,” *J. AOAC Int.*, 86, 6, 1124-1127, 2003;
- [27] T. P. A. Devasagayam, J. C. Tilak, K. K. Bloor, K. S. Sane, S. S. Ghaskadbi, R. D. Lele, “Free radicals and antioxidants in human health: current status and future prospects,” *J. Assoc. Physicians India*, 52, 794-804, 2004;
- [28] P. K. Mukherjee, V. Kumar, M. Mal, P. J. Houghton, “Acetylcholinesterase inhibitors from plants,” *Phytomedicine*, 14, 4, 289-300, 2007;
- [29] D. M. Pereira, F. Ferreres, J. M. A. Oliveira, L. Gaspar, J. Faria, P. Valentão, M. Sottomayor, P. B. Andrade, “Pharmacological effects of *Catharanthus roseus* root alkaloids in acetylcholinesterase inhibition and cholinergic neurotransmission,” *Phytomedicine*, 17, 8-9, 646-652, 2010;

- [30] M. Oztürk, İ. Tümen, A. Uğur, F. Aydoğmuş-Öztürk, G. Topçu, "Evaluation of fruit extracts of six Turkish *Juniperus* species for their antioxidant, anticholinesterase and antimicrobial activities," *J. Sci. Food Agric.*, 91, 5, 867-876, 2011;
- [31] B. N. Singh, B. R. Singh, R. L. Singh, D. Prakash, B. K. Sarma, H. B. Singh, "Antioxidant and anti-quorum sensing activities of green pod of *Acacia nilotica* L.," *Food Chem. Toxicol.*, 47, 4, 778-86, 2009;
- [32] S. Bastianetto, R. Quirion, "Natural extracts as possible protective agents of brain aging," *Neurobiol. Aging*, 23, 5, 891-897, 2002;
- [33] B. Halliwell, "Antioxidant Characterization: Methodology and Characterization," *Biochem. Pharmacol.*, 49, 10, 1341-1348, 1995;
- [34] R. Randhir, D. Vatter, K. Shetty, "Antioxidant enzyme response studies in H₂O₂-stressed porcine muscle tissue following treatment with oregano phenolic extracts," *Process Biochem.*, 40, 6, 2123-2134, 2005;
- [35] I. Oliveira, V. Coelho, R. Baltasar, J. A. Pereira, P. Baptista, "Scavenging capacity of strawberry tree (*Arbutus unedo* L.) leaves on free radicals," *Food Chem. Toxicol.*, 47, 7, 1507-1511, 2009;
- [36] S. Surveswaran, Y. Cai, H. Corke, M. Sun, "Systematic evaluation of natural phenolic antioxidants from 133 Indian medicinal plants," *Food Chem.*, 102, 3, 938-953, 2007;
- [37] M. E. Cartea, M. Francisco, P. Soengas, P. Velasco, "Phenolic compounds in Brassica vegetables.," *Molecules*, 16, 1, 251-280, 2011;
- [38] M. Antolovich, P. D. Prenzler, E. Patsalides, S. McDonald, K. Robards, "Methods for testing antioxidant activity," *Analyst*, 127, 1, 183-198, 2002;
- [39] M. Laguerre, J. Lecomte, P. Villeneuve, "Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: existing methods, new trends and challenges," *Prog. Lipid Res.*, 46, 5, 244-282, 2007;
- [40] B. H. Havsteen, "The biochemistry and medical significance of the flavonoids", 96, 2-3, 67-202, 2002;
- [41] F. Ahmadi, S. Sadeghi, M. Modarresi, R. Abiri, A. Mikaeli, "Chemical composition, in vitro anti-microbial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* Benth., of Iran," *Food Chem. Toxicol.*, 48, 5, 1137-1144, 2010;
- [42] M. Valko, D. Leibfritz, J. Moncol, M. T. D. Cronin, M. Mazur, J. Telser, "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease," *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 39, 1, 44-84, 2007;
- [43] I. Egea, P. Sánchez-Bel, F. Romojaro, M. T. Pretel, "Six edible wild fruits as potential antioxidant additives or nutritional supplements," *Plant Foods Hum. Nutr.*, 65, 2, 121-129, 2010;
- [44] G. C. Tenore, R. Ciampaglia, N. A. Arnold, F. Piozzi, F. Napolitano, D. Rigano, F. Senatore, "Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus," *Food Chem. Toxicol.*, 49, 1, 238-243, 2011;
- [45] D. Krishnaiah, R. Sarbatly, R. Nithyanandam, "A review of the antioxidant potential of medicinal plant species," *Food Bioprod. Process.*, 89, 3, 217-233, 2011;

Capítulo 6 - Referências Bibliográficas

- [46] R. Amarowicz, R. B. Pegg, P. Rahimi-Moghaddam, B. Barl, J. A. Weil, "Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies," *Food Chem.*, 84, 4, 551-562, 2004;
- [47] O. I. Aruoma, "Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods," *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, 523-524, 9-20, 2003;
- [48] I. Pasha, F. Saeed, K. Waqas, F. M. Anjum, M. U. Arshad, "Nutraceutical and functional scenario of wheat straw," *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, 53, 3, 287-295, 2013;
- [49] D. M. Pereira, P. Valentão, J. A. Pereira, P. B. Andrade, "Phenolics: From Chemistry to Biology," *Molecules*, 14, 6, 2202-2211, 2009;
- [50] A.-M. Boudet, "Evolution and current status of research in phenolic compounds," *Phytochemistry*, 68, 22-24, 2722-2735, 2007;
- [51] E. Küpeli, N. Erdemoğlu, E. Yeşilada, B. Şener, "Anti-inflammatory and antinociceptive activity of taxoids and lignans from the heartwood of *Taxus baccata* L.," *J. Ethnopharmacol.*, 89, 2-3, 265-270, 2003;
- [52] M. Çam, Y. Hışıl, G. Durmaz, "Classification of eight pomegranate juices based on antioxidant capacity measured by four methods," *Food Chem.*, 112, 3, 721-726, 2009;
- [53] C. Sánchez-Moreno, J. A. Larrauri, F. Saura-Calixto, "A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols," *J. Sci. Food Agric.*, 76, 2, 270-276, 1998;
- [54] A. Prakash, "Antioxidant Activity," *J. Agric. Food Chem.*, 44, 701-705, 2001;
- [55] B.-G. Wang, W.-W. Zhang, X.-J. Duan, and X.-M. Li, "In vitro antioxidative activities of extract and semi-purified fractions of the marine red alga, *Rhodomela confervoides* (*Rhodomelaceae*)," *Food Chem.*, 113, 4, 1101-1105, 2009;
- [56] J. M. Cruz, J. M. Domínguez, H. Domínguez, J. C. Parajó, "Antioxidant and antimicrobial effects of extracts from hydrolysates of lignocellulosic materials," *J. Agric. Food Chem.*, 49, 5, 2459-2464, 2001;
- [57] J. C. M. Barreira, I. C. F. R. Ferreira, M. B. P. P. Oliveira, J. A. Pereira, "Antioxidant activity and bioactive compounds of ten Portuguese regional and commercial almond cultivars," *Food Chem. Toxicol.*, 46, 6, 2230-2235, 2008;
- [58] R. Ksouri, H. Falleh, W. Megdiche, N. Trabelsi, B. Mhamdi, K. Chaieb, A. Bakrouf, C. Magné, C. Abdely, "Antioxidant and antimicrobial activities of the edible medicinal halophyte *Tamarix gallica* L. and related polyphenolic constituents," *Food Chem. Toxicol.*, 47, 8, 2083-2091, 2009;
- [59] T. Kulisic, A. Radonic, V. Katalinic, M. Milos, "Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil," *Food Chem.*, 85, 4, 633-640, 2004;
- [60] A. Rodríguez-Rojas, J. Rodríguez-Beltrán, A. Couce, J. Blázquez, "Antibiotics and antibiotic resistance: a bitter fight against evolution," *Int. J. Med. Microbiol.*, vol. 303, 6-7, 293-297, 2013;
- [61] P. W. Taylor, "Alternative natural sources for a new generation of antibacterial agents," *Int. J. Antimicrob. Agents*, 42, 3, 195-201, 2013;

- [62] M. Bassetti, M. Merelli, C. Temperoni, A. Astilean, "New antibiotics for bad bugs: where are we?," *Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob.*, 12, 1, 22, 2013;
- [63] G. Cox, G. D. Wright, "Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions," *Int. J. Med. Microbiol.*, 303, 6-7, 287-292, 2013;
- [64] J. Ziemska, A. Rajnisz, J. Solecka, "New perspectives on antibacterial drug research," *Cent. Eur. J. Biol.*, 8, 10, 943-957, 2013;
- [65] J. J. Richards, C. Melander, "Controlling bacterial biofilms," *ChemBiochem*, 10, 14, 2287-2294, 2009;
- [66] N. Høiby, T. Bjarnsholt, M. Givskov, S. Molin, O. Ciofu, "Antibiotic resistance of bacterial biofilms," *Int. J. Antimicrob. Agents*, 35, 4, 322-332, 2010;
- [67] E. A. Araújo, N. J. De Andrade, A. F. De Carvalho, A. Mota, L. Henrique, "Aspectos Coloidais da Adesão de Micro-Organismos," *Quim. Nova*, 33, 9, 1940-1948, 2010;
- [68] F. O'Donnell, T. J. P. Smyth, V. N. Ramachandran, W. F. Smyth, "A study of the antimicrobial activity of selected synthetic and naturally occurring quinolines," *Int. J. Antimicrob. Agents*, 35, 1, 30-38, 2010;
- [69] Y. C. Fiamegos, P. L. Kastritis, V. Exarchou, H. Han, A. M. J. J. Bonvin, J. Vervoort, K. Lewis, M. R. Hamblin, G. P. Tegos, "Antimicrobial and efflux pump inhibitory activity of caffeoylquinic acids from *Artemisia absinthium* against gram-positive pathogenic bacteria," *PLoS One*, 6, 4, e18127, 2011;
- [70] G. N. Teke, J. Kuate, V. Kueté, R. B. Teponno, L. A. Tapondjou, P. Tane, "Bio-guided isolation of potential antimicrobial and antioxidant agents from the stem bark of *Trilepisium madagascariense*," *South African J. Bot.*, 77, 2, 319-327, 2011;
- [71] T. P. T. Cushnie, A. J. Lamb, "Antimicrobial activity of flavonoids," *Int. J. Antimicrob. Agents*, 26, 5, 343-356, 2005;
- [72] J. L. Ríos, M. C. Recio, "Medicinal plants and antimicrobial activity," *J. Ethnopharmacol.*, 100, 1-2, 80-84, 2005;
- [73] S. Ferreira, J. Santos, A. Duarte, A. P. Duarte, J. A. Queiroz, F. C. Domingues, "Screening of antimicrobial activity of *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* extracts," *Nat. Prod. Res.*, 37-41, 2011;
- [74] F. Silva, S. Ferreira, A. Duarte, D. I. Mendonça, F. C. Domingues, "Antifungal activity of *Coriandrum sativum* essential oil, its mode of action against *Candida* species and potential synergism with amphotericin B," *Phytomedicine*, 19, 1, 42-47, 2011;
- [75] A. Duarte, S. Ferreira, F. Silva, F. C. Domingues, "Synergistic activity of coriander oil and conventional antibiotics against *Acinetobacter baumannii*," *Phytomedicine*, 19, 3-4, 236-238, 2012;
- [76] A. Duarte, S. Ferreira, R. Oliveira, F. Domingues, "Effect of Coriander Oil (*Coriandrum sativum*) on Planktonic and Biofilm Cells of *Acinetobacter baumannii*," *Nat. Prod. Commun.*, 8, 5, 673-678, 2013;
- [77] M. Simões, R. N. Bennett, E. A. S. Rosa, "Understanding antimicrobial activities of phytochemicals against multidrug resistant bacteria and biofilms," *Nat. Prod. Rep.*, 26, 6, 746-757, 2009;

Capítulo 6 - Referências Bibliográficas

- [78] A. Klancnik, S. Piskernik, B. Jersek, S. S. Mozina, "Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts," *J. Microbiol. Methods*, 81, 2, 121-126, 2010;
- [79] R. Schwalbe, L. Steele-Moore, A. Goodwin, *Antimicrobial Susceptibility Testing Protocols*, 1st Ed. Boca Raton: CRC Press - Taylor & Francis Group, 2007;
- [80] L. J. Shai, L. J. McGaw, M. A. Aderogba, L. K. Mdee, J. N. Eloff, "Four pentacyclic triterpenoids with antifungal and antibacterial activity from *Curtisia dentata* (Burm.f) C.A. Sm. leaves," *J. Ethnopharmacol.*, 119, 2, 238-244, 2008;
- [81] S. Karuppusamy, K. M. Rajasekaran, "High Throughput Antibacterial Screening of Plant Extracts by Resazurin Redox with Special Reference to Medicinal Plants of Western Ghats," *Glob. J. Pharmacol.*, 3, 2, 63-68, 2009;
- [82] T. Coenye, H. J. Nelis, "In vitro and in vivo model systems to study microbial biofilm formation," *J. Microbiol. Methods*, 83, 2, 89-105, 2010;
- [83] A. Silva, C. Meireles, C. Dias, F. Sales, J. Conde, L. Salgueiro, T. Batista, *Plantas Aromáticas e Medicinais do Parque Natural da Serra da Estrela - Guia Etnobotânico*, CISE-Município de Seia;
- [84] J. Jansen, *Geobotanical guide of the Serra da Estrela*, Parque Natural da Serra da Estrela, Instituto da Conservação da Natureza, 2002;
- [85] H. Catanho, *Parques e Reservas Naturais de Portugal*, Bexal-Prod;
- [86] A. Aparicio, R. Guisande, "Replenishment of the endangered *Echinopartum algibicum* (*Genisteae*, *Fabaceae*) from the soil seed bank," *Biol. Conserv.*, 3207, 96, 267-273, 1997;
- [87] P. Taylor, F. M. Ferreira, L. T. Dinis, P. Azedo, C. I. C. Galhano, A. Simões, S. M. Cardoso, M. Rosário, M. Domingues, O. R. Pereira, C. M. Palmeira, F. P. Peixoto, M. Cardoso, F. P. Peixoto, "Antioxidant capacity and toxicological evaluation of *Pterospartum tridentatum* flower extracts," *CyTA-Journal Food*, 10, 2, 92-102, 2012;
- [88] A. Clara Grosso, M. M. Costa, L. Ganço, A. L. Pereira, G. Teixeira, J. M. G. Lavado, A. Cristina Figueiredo, J. G. Barroso, L. G. Pedro, "Essential oil composition of *Pterospartum tridentatum* grown in Portugal," *Food Chem.*, 102, 4, 1083-1088, 2007;
- [89] S. Ferreira, N. Gil, J. A. Queiroz, A. P. Duarte, F. C. Domingues, "Bioethanol from the Portuguese forest residue *Pterospartum tridentatum*-an evaluation of pretreatment strategy for enzymatic saccharification and sugars fermentation," *Bioresour. Technol.*, 101, 20, 7797-7803, 2010;
- [90] M. T. Coelho, J. C. Gonçalves, V. Alves, M. M.- Martins, "Antioxidant activity and phenolic content of extracts from different *Pterospartum tridentatum* populations growing in Portugal," *Procedia Food Sci.*, 1, 1454-1458, 2011;
- [91] R. F. Vitor, H. Mota-Filipe, G. Teixeira, C. Borges, A. I. Rodrigues, A. Teixeira, A. Paulo, "Flavonoids of an extract of *Pterospartum tridentatum* showing endothelial protection against oxidative injury," *J. Ethnopharmacol.*, 93, 2-3, 63-70, 2004;
- [92] A. Paulo, S. Martins, P. Branco, T. Dias, C. Borges, A. I. Rodrigues, C. Costa, A. Teixeira, H. Mota-filipe, "The Opposing Effects of the Flavonoids Isoquercitrin and Sissotrin, isolated from *Pterospartum tridentatum*, on Oral Glucose Tolerance in Rats," *Phyther. Res.*, 543, 539-543, 2008;

- [93] Â. Luís, F. Domingues, C. Gil, A. P. Duarte, "Antioxidant activity of extracts of Portuguese shrubs: *Pterospartum tridentatum*, *Cytisus scoparius* and *Erica* spp.," *J. Medicinal Plants Res.*, 3, 11, 886-893, 2009;
- [94] S. C. Sati, S. Joshi, D. S. B. Campus, "Antibacterial potential of leaf extracts of *Juniperus communis* L. from Kumaun Himalaya," *African J. Microbiol. Res.*, 4, 12, 1291-1294, 2010;
- [95] C. Cabral, V. Francisco, C. Cavaleiro, M. J. Gonçalves, M. T. Cruz, F. Sales, M. T. Batista, L. Salgueiro, "Essential oil of *Juniperus communis* subsp. *alpina* (Suter) Čelak needles: chemical composition, antifungal activity and cytotoxicity," *Phyther. Res.*, 26, 9, 1352-1357, 2012;
- [96] S. Vichi, M. Riu-Aumatell, M. Mora-Pons, J. M. Guadayol, S. Buxaderas, E. López-Tamames, "HS-SPME coupled to GC/MS for quality control of *Juniperus communis* L. berries used for gin aromatization," *Food Chem.*, 105, 4, 1748-1754, 2007;
- [97] P. Chatzopoulou, S. T. Katsiotis, "Procedures influencing the yield and the quality of the essential oil from *Juniperus communis* L. berries," *Pharm. Acta Helv.*, 6865, 95, 247-253, 1995;
- [98] I. Karaman, F. Şahin, M. Güllüce, H. Öğütçü, M. Şengül, A. Adıgüzel, "Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L.," *J. Ethnopharmacol.*, 85, 2-3, 231-235, 2003;
- [99] Y. Inatomi, H. Murata, A. Inada, T. Nakanishi, F. A. Lang, J. Murata, M. Inuma, "New glycosides of acetophenone derivatives and phenylpropanoids from *Juniperus occidentalis*," *J. Nat. Med.*, 67, 2, 359-368, 2013;
- [100] L. M. Moujir, A. M. L. Seca, L. Araujo, A. M. S. Silva, M. C. Barreto, "A new natural spiro heterocyclic compound and the cytotoxic activity of the secondary metabolites from *Juniperus brevifolia* leaves," *Fitoterapia*, 82, 2, 225-229, 2011;
- [101] N. Filipowicz, M. Kamiński, J. Kurlenda, M. Asztemborska, J. R. Ochocka, "Antibacterial and antifungal activity of juniper berry oil and its selected components," *Phytother. Res.*, 17, 3, 227-231, 2003;
- [102] A. Y. Gordien, A. I. Gray, S. G. Franzblau, V. Seidel, "Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L. (*Cupressaceae*)," *J. Ethnopharmacol.*, 126, 3, 500-505, 2009;
- [103] C. D. Carpenter, T. O'Neill, N. Picot, J. A. Johnson, G. A. Robichaud, D. Webster, C. A. Gray, "Anti-mycobacterial natural products from the Canadian medicinal plant *Juniperus communis*," *J. Ethnopharmacol.*, 143, 2, 695-700, 2012;
- [104] N. Miceli, A. Trovato, P. Dugo, F. Cacciola, P. Donato, A. Marino, V. Bellinghieri, T. M. La Barbera, A. Güvenç, M. F. Taviano, "Comparative analysis of flavonoid profile, antioxidant and antimicrobial activity of the berries of *Juniperus communis* L. var. *communis* and *Juniperus communis* L. var. *saxatilis* Pall. from Turkey," *J. Agric. Food Chem.*, 57, 15, 6570-6657, 2009;
- [105] Y. Mimaki, M. Kuroda, A. Kameyama, A. Yokosuka, Y. Sashida, "Steroidal saponins from the underground parts of *Ruscus aculeatus* and their cytostatic activity on HL-60 cells," *Phytochemistry*, 48, 3, 485-493, 1998;
- [106] A. L. I. Oulad-ali, D. Guillaume, R. Belle, B. Davld, R. Anton, "Sulphated steroidal derivatives from *Ruscus aculeatus*," *Phytochemistry*, 42, 3, 895-897, 1996;

Capítulo 6 - Referências Bibliográficas

- [107] S. De Marino, C. Festa, F. Zollo, M. Iorizzi, "Novel steroidal components from the underground parts of *Ruscus aculeatus* L.," *Molecules*, 17, 12, 14002-14014, 2012;
- [108] A. Mari, A. Napolitano, A. Perrone, C. Pizza, S. Piacente, "An analytical approach to profile steroidal saponins in food supplements: The case of *Ruscus aculeatus*," *Food Chem.*, 134, 1, 461-468, 2012;
- [109] A. Di Lazzaro, A. Morana, C. Schiraldi, A. Martino, C. Ponzzone, M. De Rosa, "An enzymatic process for the production of the pharmacologically active glycoside desglucodesrhamnoruscin from *Ruscus aculeatus* L.," *J. Mol. Catal. B Enzym.*, 11, 4-6, 307-314, 2001;
- [110] Y. Mimaki, M. Kuroda, A. Yokosuka, Y. Sashida, "A spirostanol saponin from the underground parts of *Ruscus aculeatus*," *Phytochemistry*, 51, 5, 689-692, 1999;
- [111] S. Mangas, M. Bonfill, L. Osuna, E. Moyano, J. Tortoriello, R. M. Cusido, M. T. Piñol, J. Palazón, "The effect of methyl jasmonate on triterpene and sterol metabolisms of *Centella asiatica*, *Ruscus aculeatus* and *Galphimia glauca* cultured plants," *Phytochemistry*, 67, 18, 2041-2049, 2006;
- [112] M. Sisti, M. De Santi, D. Fraternali, P. Ninfali, V. Scoccianti, G. Brandi, "Antifungal activity of *Rubus ulmifolius* Schott standardized in vitro culture," *LWT - Food Sci. Technol.*, 41, 5, 946-950, 2008;
- [113] G. Flamini, S. Catalano, C. Caponi, L. Panizzi, I. Morelli, "Three anthrones from *Rubus ulmifolius*," *Phytochemistry*, 59, 8, 873-876, 2002;
- [114] L. Panizzi, C. Caponi, S. Catalano, P. L. Cioni, I. Morelli, "In vitro antimicrobial activity of extracts and isolated constituents of *Rubus ulmifolius*," *J. Ethnopharmacol.*, 79, 2, 165-168, 2002;
- [115] S. Martini, C. D'Addario, A. Colacevich, S. Focardi, F. Borghini, A. Santucci, N. Figura, C. Rossi, "Antimicrobial activity against *Helicobacter pylori* strains and antioxidant properties of blackberry leaves (*Rubus ulmifolius*) and isolated compounds," *Int. J. Antimicrob. Agents*, 34, 1, 50-59, 2009;
- [116] C. Brandi, G. Amagliani, M. Sisti, D. Fraternali, P. Ninfali, V. Scoccianti, "Antibacterial Activity of a Stable Standardized in vitro Culture of *Rubus ulmifolius* Schott Against Food-Borne Pathogenic Bacteria," *Ital. J. Food Sci.*, 19, 471-477, 2007;
- [117] C. L. Quave, M. Estévez-Carmona, C. M. Compadre, G. Hobby, H. Hendrickson, K. E. Beenken, M. S. Smeltzer, "Ellagic acid derivatives from *Rubus ulmifolius* inhibit *Staphylococcus aureus* biofilm formation and improve response to antibiotics," *PLoS One*, 7, 1, e28737, 2012;
- [118] C. L. Quave, L. R. W. Plano, T. Pantuso, and B. C. Bennett, "Effects of extracts from Italian medicinal plants on planktonic growth, biofilm formation and adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*," *J. Ethnopharmacol.*, 118, 3, 418-428, 2009;
- [119] S. Dall'Acqua, R. Cervellati, M. C. Loi, G. Innocenti, "Evaluation of in vitro antioxidant properties of some traditional Sardinian medicinal plants: Investigation of the high antioxidant capacity of *Rubus ulmifolius*," *Food Chem.*, 106, 2, 745-749, 2008;
- [120] L. Barros, S. Oliveira, A. M. Carvalho, I. C. F. R. Ferreira, "In vitro antioxidant properties and characterization in nutrients and phytochemicals of six medicinal plants from the Portuguese folk medicine," *Ind. Crops Prod.*, 32, 3, 572-579, 2010;

- [121] M. H. Novais, I. Santos, S. Mendes, C. Pinto-Gomes, "Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal)," *J. Ethnopharmacol.*, 93, 2-3, 183-195, 2004;
- [122] M. Pardo-de-Santayana, J. Tardío, E. Blanco, A. M. Carvalho, J. J. Lastra, E. San Miguel, R. Morales, "Traditional knowledge of wild edible plants used in the northwest of the Iberian Peninsula (Spain and Portugal): a comparative study," *J. Ethnobiol. Ethnomed.*, 3, 27, 2007;
- [123] M. F. Sousa, A. R. Façanha, R. M. Tavares, T. Lino-Neto, H. Gerós, "Phosphate transport by proteoid roots of *Hakea sericea*," *Plant Sci.*, 173, 5, 550-558, 2007;
- [124] D. C. Le Maitre, R. M. Krug, J. H. Hoffmann, A. J. Gordon, T. N. Mgidi, "*Hakea sericea*: Development of a model of the impacts of biological control on population dynamics and rates of spread of an invasive species," *Ecol. Modell.*, 212, 3-4, 342-358, 2008;
- [125] J. Barr, V. Murty, K. Yamaguchi, S. Singh, D. Smith, and S. Hecht, "5-Alkylresorcinols from *Hakea amplexicaulis* That Cleave DNA," *Chem. Res. Toxicol.*, 1, 4, 204-207, 1988;
- [126] A. M. Madureira, A. Duarte, G. Teixeira, "Antimicrobial activity of selected extracts from *Hakea salicifolia* and *H. sericeae* (Proteaceae) against *Staphylococcus aureus* multiresistant strains," *South African J. Bot.*, 81, 40-43, 2012;
- [127] O. R. Pereira, A. M. S. Silva, M. R. M. Domingues, S. M. Cardoso, "Identification of phenolic constituents of *Cytisus multiflorus*," *Food Chem.*, 131, 2, 652-659, 2012;
- [128] S. Raja, K. F. H. N. Ahamed, V. Kumar, K. Mukherjee, A. Bandyopadhyay, P. K. Mukherjee, "Antioxidant effect of *Cytisus scoparius* against carbon tetrachloride treated liver injury in rats," *J. Ethnopharmacol.*, 109, 1, 41-47, 2007;
- [129] L. Barros, L. Cabrita, M. V. Boas, A. M. Carvalho, I. C. F. R. Ferreira, "Chemical, biochemical and electrochemical assays to evaluate phytochemicals and antioxidant activity of wild plants," *Food Chem.*, 127, 4, 1600-1608, 2011;
- [130] L. Barros, A. M. Carvalho, I. C. F. R. Ferreira, "Comparing the composition and bioactivity of *Crataegus monogyna* flowers and fruits used in folk medicine," *Phytochem. Anal.*, 22, 2, 181-188, 2010;
- [131] J. C. M. Barreira, S. Rodrigues, A. M. Carvalho, I. C. F. R. Ferreira, "Development of hydrosoluble gels with *Crataegus monogyna* extracts for topical application: Evaluation of antioxidant activity of the final formulations," *Ind. Crops Prod.*, 42, 175-180, 2013;
- [132] T. Bahorun, E. Aumjaud, H. Ramphul, M. Rycha, A. Luximon-Ramma, F. Trotin, O. I. Aruoma, "Phenolic constituents and antioxidant capacities of *Crataegus monogyna* (Hawthorn) callus extracts," *Nahrung/Food*, 47, 3, 191-198, 2003;
- [133] V. Tadic, S. Dobric, G. Markovic, S. Dordevic, I. Arsic, N. Menkovic, T. Stevic, "Anti-inflammatory, Gastroprotective, Free-Radical-Scavenging, and Antimicrobial Activities of Hawthorn Berries Ethanol Extract," *J. Agric. Food Chem.*, 56, 7700-7709, 2008;
- [134] M. D. García, M. T. Sáenz, M. C. Ahumada, A. Cert, "Isolation of three triterpenes and several aliphatic alcohols from *Crataegus monogyna* Jacq.," *J. Chromatogr. A*, 767, 1-2, 340-342, 1997;
- [135] W. Peschel, C. Bohr, A. Plescher, "Variability of total flavonoids in *Crataegus* – Factor evaluation for the monitored production of industrial starting material," *Fitoterapia*, 79, 1, 6-20, 2008;

Capítulo 6 - Referências Bibliográficas

- [136] A. Urbonaviciūte, V. Jakstas, O. Kornysova, V. Janulis, A. Maruska, "Capillary electrophoretic analysis of flavonoids in single-styled hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) ethanolic extracts," *J. Chromatogr. A*, 1112, 1-2, 339-344, 2006;
- [137] J. Valls, T. Richard, F. Trotin, J. Monti, J. Merillon, X. Vitrac, "Carbon-14 biolabeling of flavanols and chlorogenic acids in *Crataegus monogyna* cell suspension cultures," *Food Chem.*, 105, 2, 879-882, 2007;
- [138] M. Özyürek, M. Bener, K. Güçlü, A. A. Dönmez, S. Pırıldar, A. H. Meriçli, R. Apak, "Evaluation of Antioxidant Activity of *Crataegus* Species Collected from Different Regions of Turkey," *Rec. Nat. Prod.*, 6, 3, 263-277, 2012;
- [139] S. Salehi, S. R. Long, P. J. Proteau, T. M. Filtz, "Hawthorn (*Crataegus monogyna* Jacq.) extract exhibits atropine-sensitive activity in a cultured cardiomyocyte assay," *J. Nat. Med.*, 63, 1, 1-8, 2009;
- [140] S. Rodrigues, R. C. Calhelha, J. C. M. Barreira, M. Dueñas, A. M. Carvalho, R. M. V. Abreu, C. Santos-Buelga, I. C. F. R. Ferreira, "*Crataegus monogyna* buds and fruits phenolic extracts: Growth inhibitory activity on human tumor cell lines and chemical characterization by HPLC-DAD-ESI/MS," *Food Res. Int.*, 49, 1, 516-523, 2012;
- [141] F. Bahadori, M. Ay, H. Nazemiyeh, I. Choudhary, B. Sciences, "Two New Phenylpropanoid Glycosides from the Leaves and Flowers of *Erica arborea*," *Helv. Chim. Acta*, 93, 77-83, 2010;
- [142] E. K. Akkol, E. Yeşilada, A. Güvenç, "Valuation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Erica* species native to Turkey," *J. Ethnopharmacol.*, 116, 2, 251-257, 2008;
- [143] C. Sadki, B. Hacht, A. Souliman, F. Atmani, "Acute diuretic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers and *Cynodon dactylon* rhizomes extracts in rats," *J. Ethnopharmacol.*, 128, 2, 352-356, 2010;
- [144] H. Harnafi, N. E. H. Bouanani, M. Aziz, H. Serghini Caid, N. Ghalim, S. Amrani, "The hypolipidaemic activity of aqueous *Erica multiflora* flowers extract in Triton WR-1339 induced hyperlipidaemic rats: a comparison with fenofibrate," *J. Ethnopharmacol.*, 109, 1, 156-160, 2007;
- [145] M. Ay, F. Bahadori, M. Oztürk, U. Kolak, G. Topçu, "Antioxidant activity of *Erica arborea*," *Fitoterapia*, 78, 7-8, 571-573, 2007;
- [146] B. Márquez-García, F. Córdoba, "Antioxidative system in wild populations of *Erica andevalensis*," *Environ. Exp. Bot.*, 68, 1, 58-65, 2010;
- [147] N. J. Basson, S. R. Grobler, "Antimicrobial activity of two South African honeys produced from indigenous *Leucospermum cordifolium* and *Erica species* on selected micro-organisms," *BMC Complement. Altern. Med.*, 8, 41, 2008;
- [148] L. Estevinho, A. P. Pereira, L. Moreira, L. G. Dias, E. Pereira, "Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey," *Food Chem. Toxicol.*, 46, 12, 3774-3779, 2008;
- [149] I. Konczak-Islam, M. Yoshimoto, D.-X. Hou, N. Terahara, O. Yamakawa, "Potential chemopreventive properties of anthocyanin-rich aqueous extracts from in vitro produced tissue of sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.)," *J. Agric. Food Chem.*, 51, 20, 5916-5922, 2003;

- [150] R.-J. Lin, C.-Y. Chen, W.-L. Lo, "Cytotoxic activity of *Ipomoea cairica*," *Nat. Prod. Res.*, 22, 9, 747-753, 2008;
- [151] A. Zulfiqar, H. Ren, J. Zhang, J. Li, X. Cui, Y. Xie, "Molecular characterization of two isolates of sweet potato leaf curl virus infecting *Ipomoea indica* in China," *African J. Biotechnol.*, 10, 45, 9061-9067, 2011;
- [152] N. Terahara, I. Konczak, H. Ono, M. Yoshimoto, O. Yamakawa, "Characterization of Acylated Anthocyanins in Callus Induced From Storage Root of Purple-Fleshed Sweet Potato, *Ipomoea batatas* L.," *J. Biomed. Biotechnol.*, 2004, 5, 279-286, 2004;
- [153] V. De Feo, L. De Martino, E. Quaranta, C. Pizza, "Isolation of phytotoxic compounds from tree-of-heaven (*Ailanthus altissima* Swingle)," *J. Agric. Food Chem.*, 51, 5, 1177-1180, 2003;
- [154] K. Mall, "Evaluation of Washing Procedures for Pollution Analysis of *Ailanthus altissima* Leaves," *Environ. Pollut.*, 12, 195-202, 1986;
- [155] E. Gravano, V. Giuliotti, R. Desotgiu, F. Bussotti, P. Grossoni, G. Gerosa, C. Tani, "Foliar response of an *Ailanthus altissima* clone in two sites with different levels of ozone-pollution," *Environ. Pollut.*, 121, 1, 137-146, 2003;
- [156] F. Albouchi, I. Hassen, H. Casabianca, K. Hosni, "Phytochemicals, antioxidant, antimicrobial and phytotoxic activities of *Ailanthus altissima* (Mill.) Swingle leaves," *South African J. Bot.*, 87, 164-174, 2013;
- [157] Z.-L. Hong, J. Xiong, S.-B. Wu, J.-J. Zhu, J.-L. Hong, Y. Zhao, G. Xia, J.-F. Hu, "Tetracyclic triterpenoids and terpenylated coumarins from the bark of *Ailanthus altissima* ('Tree of Heaven')," *Phytochemistry*, 86, 159-167, 2013;
- [158] Y. Wang, W.-J. Wang, C. Su, D.-M. Zhang, L.-P. Xu, R.-R. He, L. Wang, J. Zhang, X.-Q. Zhang, W.-C. Ye, "Cytotoxic quassinoids from *Ailanthus altissima*," *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, 23, 3, 654-657, 2013;
- [159] A. Rahman, E. L. Kim, S. C. Kang, "Antibacterial and Antioxidant Properties of *Ailanthus altissima* Swingle Leave Extract To Reduce Foodborne Pathogens and Spoiling Bacteria," *J. Food Saf.*, 29, 4, 499-510, 2009;
- [160] V. De Feo, L. De Martino, A. Santoro, A. Leone, C. Pizza, S. Franceschelli, M. Pascale, "Antiproliferative effects of tree-of-heaven (*Ailanthus altissima* Swingle)," *Phytother. Res.*, 19, 3, 226-230, 2005;
- [161] T.-H. Kang, I.-Y. Choi, S.-J. Kim, P.-D. Moon, J.-U. Seo, J.-J. Kim, N.-H. An, S.-H. Kim, M.-H. Kim, J.-Y. Um, S.-H. Hong, H.-M. Kim, H.-J. Jeong, "*Ailanthus altissima* Swingle has anti-anaphylactic effect and inhibits inflammatory cytokine expression via suppression of nuclear factor-kappaB activation," *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.*, 46, 1, 72-81, 2010;
- [162] P. Baptista, A. P. Costa, R. Simões, M. E. Amaral, "*Ailanthus altissima*: An alternative fiber source for papermaking," *Ind. Crops Prod.*, 52, 32-37, 2014;
- [163] P. J. T. Ferreira, J. A. F. Gamelas, M. G. V. S. Carvalho, G. V. Duarte, J. M. P. L. Canhoto, R. Passas, "Evaluation of the papermaking potential of *Ailanthus altissima*," *Ind. Crops Prod.*, 42, 538-542, 2013;

Capítulo 6 - Referências Bibliográficas

- [164] N. Gil, S. Ferreira, M. E. Amaral, F. C. Domingues, A. P. Duarte, "The influence of dilute acid pretreatment conditions on the enzymatic saccharification of *Erica* spp. for bioethanol production," *Ind. Crops Prod.*, 32, 1, 29-35, 2010;
- [165] W. Xu, F. Zhang, Y. Luo, L. Ma, X. Kou, K. Huang, "Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum*," *Carbohydr. Res.*, 344, 2, 217-222, 2009;
- [166] M. Kassim, M. Achoui, M. R. Mustafa, M. A. Mohd, K. M. Yusoff, "Ellagic acid, phenolic acids, and flavonoids in Malaysian honey extracts demonstrate in vitro anti-inflammatory activity," *Nutr. Res.*, 30, 9, 650-659, 2010;
- [167] E. Karimi, H. Z. E. Jaafar, "HPLC and GC-MS determination of bioactive compounds in microwave obtained extracts of three varieties of *Labisia pumila* Benth.," *Molecules*, 16, 8, 6791-6805, 2011;
- [168] L. Barros, A. M. Carvalho, I. C. F. R. Ferreira, "Comparing the composition and bioactivity of *Crataegus monogyna* flowers and fruits used in folk medicine," *Phytochem. Anal.*, 22, 2, 181-188, 2011;
- [169] A. Alim, I. Goze, H. M. Goze, B. Tepe, and J. Serkedjieva, "In vitro antimicrobial and antiviral activities of the essential oil and various extracts of *Salvia cedronella* Boiss.," *J. Med. Plants Res.*, 3, 5, 413-419, 2009;
- [170] D. Andrade, C. Gil, L. Breitenfeld, F. Domingues, A. P. Duarte, "Bioactive extracts from *Cistus ladanifer* and *Arbutus unedo* L.," *Ind. Crops Prod.*, 30, 1, 165-167, 2009;
- [171] V. De Luca, B. S. Pierre, "The cell and developmental biology of alkaloid biosynthesis," *Trends Plant Sci.*, 5, 4, 168-173, 2000;
- [172] A. Rajaei, M. Barzegar, A. M. Mobarez, M. A. Sahari, Z. H. Esfahani, "Antioxidant, antimicrobial and antimutagenicity activities of pistachio (*Pistachia vera*) green hull extract," *Food Chem. Toxicol.*, 48, 1, 107-112, 2010;
- [173] L. Fu, B.-T. Xu, X.-R. Xu, X.-S. Qin, R.-Y. Gan, H.-B. Li, "Antioxidant capacities and total phenolic contents of 56 wild fruits from South China," *Molecules*, 15, 12, 8602-8617, 2010;
- [174] G. Miliuskas, P. R. Venskutonis, T. A. van Beek, "Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts," *Food Chem.*, 85, 2, 231-237, 2004;
- [175] H. Kelebek, S. Selli, A. Canbas, T. Cabaroglu, "HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan," *Microchem. J.*, 91, 2, 187-192, 2009;
- [176] D. K. Bardsley, G. Edwards-Jones, "Invasive species policy and climate change: social perceptions of environmental change in the Mediterranean," *Environ. Sci. Policy*, 10, 3, 230-242, 2007;
- [177] D. D. Orhan, B. Ozçelik, S. Ozgen, F. Ergun, "Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of some flavonoids," *Microbiol. Res.*, 165, 6, 496-504, 2010;
- [178] V. Kuete, G. F. Wabo, B. Ngameni, A. T. Mbaveng, R. Metuno, F.-X. Etoa, B. T. Ngadjui, V. P. Beng, J. J. M. Meyer, N. Lall, "Antimicrobial activity of the methanolic extract, fractions and compounds from the stem bark of *Irvingia gabonensis* (*Ixonanthaceae*)," *J. Ethnopharmacol.*, 114, 1, 54-60, 2007;

- [179] E. J. T. Mbosso, S. Ngouela, J. C. A. Nguedia, V. P. Beng, M. Rohmer, E. Tsamo, "In vitro antimicrobial activity of extracts and compounds of some selected medicinal plants from Cameroon," *J. Ethnopharmacol.*, 128, 2, 476-481, 2010;
- [180] A. Smith-Palmer, J. Stewart, L. Fyfe, "Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens," *Let. Appl. Microbiol.*, 26, 2, 118-122, 1998;
- [181] A. Nostro, M. P. Germanò, V. D'Angelo, A. Marino, M. A. Cannatelli, "Extraction methods and bioautography for evaluation of medicinal plant antimicrobial activity," *Let. Appl. Microbiol.*, 30, 5, 379-384, 2000;
- [182] A. F. Raja, F. Ali, I. A. Khan, A. S. Shawl, D. S. Arora, B. A. Shah, S. C. Taneja, "Antistaphylococcal and biofilm inhibitory activities of acetyl-11-keto- β -boswellic acid from *Boswellia serrata*," *BMC Microbiol.*, 11, 1, 54, 2011;
- [183] P. Sharma, J. D. Sharma, "In vitro hemolysis of human erythrocytes - by plant extracts with antiplasmodial activity," *J. Ethnopharmacol.*, 74, 3, 239-243, 2001;
- [184] M. Shoemaker, I. Cohen, M. Campbell, "Reduction of MTT by aqueous herbal extracts in the absence of cells," *J. Ethnopharmacol.*, 93, 2-3, 381-384, 2004;
- [185] A. M. Móricz, S. Szarka, P. G. Ott, E. B. Héthelyi, E. Szoke, E. Tyihák, "Separation and identification of antibacterial chamomile components using OPLC, bioautography and GC-MS," *Med. Chem.*, 8, 1, 85-94, 2012;
- [186] S. Sarker, L. Nahar, Y. Kumarasamy, "Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals," *Methods*, 42, 4, 321-324, 2007;
- [187] V. S. P. Chaturvedula, J. K. Schilling, J. S. Miller, R. Andriantsiferana, V. E. Rasamison, D. G. I. Kingston, "New cytotoxic bis 5-alkylresorcinol derivatives from the leaves of *Oncostemon bojerianum* from the Madagascar rainforest," *J. Nat. Prod.*, 65, 11, 1627-1632, 2002;
- [188] T.-H. Chuang, P.-L. Wu, "Cytotoxic 5-alkylresorcinol metabolites from the leaves of *Grevillea robusta*," *J. Nat. Prod.*, 70, 2, 319-323, 2007;
- [189] L. Sánchez, D. Olmedo, J. López-Pérez, T. Williams, M. Gupta, "Two new Alkylresorcinols from *Homalomena wedlandii* and Their Cytotoxic Activity," *Nat. Prod. Commun.*, 7, 8, 1043-1046, 2012;
- [190] C. M. Starks, R. B. Williams, V. L. Norman, J. A. Lawrence, M. O'Neil-Johnson, G. R. Eldridge, "Phenylpropanoids from *Phragmipedium calurum* and their antiproliferative activity," *Phytochemistry*, 82, 172-175, 2012;
- [191] C. Jime, D. Torres-Mendoza, L. D. Uren, E. Ortega-barri, K. L. Mcphail, W. H. Gerwick, L. Cubilla-rios, "Hydroxyalkenylresorcinols from *Stylogyne turbacensis*," *J. Nat. Prod.*, 70, 1249-1252, 2007;
- [192] P. López, G. Ferraro, C. Anesini, "Comparative antioxidant activity of an extract of *Lithraea molleoides* and an isolated 5-alkylresorcinol derivative. Effects on the proliferation of normal and tumoral lymphocytes," *Phyther. Res.*, 25, 2, 271-276, 2011;
- [193] A. Borges, M. J. Saavedra, M. Simões, "The activity of ferulic and gallic acids in biofilm prevention and control of pathogenic bacteria," *Biofouling*, 28, 37-41, 2012;

Capítulo 6 - Referências Bibliográficas

- [194] Y.-I. Kwon, E. Apostolidis, R. G. Labbe, K. Shetty, "Inhibition of *Staphylococcus aureus* by Phenolic Phytochemicals of Selected Clonal Herbs Species of *Lamiaceae* Family and Likely Mode of Action through Proline Oxidation," *Food Biotechnol.*, 21, 1, 71-89, 2007;
- [195] F. Silva, S. Ferreira, J. A. Queiroz, F. C. Domingues, "Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry," *J. Med. Microbiol.*, 60, 10, 1479-1486, 2011;
- [196] M. Simões, L. C. Simões, S. Cleto, M. O. Pereira, M. J. Vieira, "The effects of a biocide and a surfactant on the detachment of *Pseudomonas fluorescens* from glass surfaces," *Int. J. Food Microbiol.*, 121, 3, 335-341, 2008.

**Apêndice - Notas sobre a colheita, identificação e
preparação das espécies vegetais para
catalogação em Herbário**

Colheita, identificação e catalogação das espécies vegetais

Os troncos, caules e folhas das plantas utilizadas neste trabalho foram colhidos na época imediatamente antes da floração, por ser nesta altura que a planta se encontra em plena atividade, portanto quando se começam a desenvolver os órgãos reprodutores e os sucos nutritivos e a produção de metabolitos secundários é mais acentuada. As flores foram colhidas no auge da floração e os frutos no seu estado completo de maturação. A colheita foi feita de modo a obter a quantidade necessária de cada uma das estruturas vegetais, após moagem. As amostras foram mantidas em sacos de papel, evitando assim o contacto com o plástico que poderia contaminar os espécimes com quantidades residuais de ftalatos, o que influenciaria as determinações analíticas posteriores. Após colheita, as plantas foram secas numa estufa ventilada a 35°C e processadas de acordo com o descrito anteriormente nos artigos.

Para a identificação das espécies e sua posterior catalogação em Herbário, as plantas foram colhidas de modo a recolher todas as suas partes aéreas em simultâneo, nomeadamente caules, folhas, flores e/ou frutos, sempre que possível. A data e as coordenadas GPS do local da colheita foram devidamente registadas. De seguida as amostras foram analisadas pelas Botânicas do Instituto Superior de Agronomia (Jardim Botânico d'Ajuda, Lisboa) e as espécies foram identificadas, classificadas de acordo com a nomenclatura científica binomial e preparadas para que vouchers dos espécimes vegetais ficassem conservados e catalogados em Herbário.

A conservação das plantas no Herbário João de Carvalho e Vasconcellos obedeceu a um prévio processo de secagem, no qual se utilizaram folhas de papel absorvente, no meio das quais se colocou a planta ou parte dela (quando a mesma era grande ou de consistência lenhosa), sendo o conjunto assim obtido prensado; o papel foi mudado de 24 em 24h, até se apresentar completamente seco. Depois fez-se a montagem da planta, já seca, numa prancha de Herbário (cartolina branca, de tamanho A3); para se prender a planta usou-se tela gomada. As plantas foram depois congeladas durante três dias, para garantir que nenhum inseto as acompanhava e só depois disso organizadas, na devida ordem, nos armários metálicos da sala do Herbário, onde a temperatura e a humidade são controladas. Às plantas que deram entrada no Herbário foi-lhes atribuído um número que foi registado no caderno próprio. De seguida, no arquivo geral, na ficha respeitante à espécie (ou *táxon* inferior) foi registado o número da planta, o Concelho e local onde foram colhidas, a data e o nome do coletor. Este registo foi efetuado, igualmente, numa base de dados que utiliza o programa *Herbar*, comum a grande parte dos Herbários. A partir destes registos é fácil de se saber qual o material existente e qual a sua proveniência.

A lista completa das plantas utilizadas, os seus nomes científico e comum, os números dos vouchers e as suas origens encontram-se registadas na Tabela 1.

Tabela 1: Listagem das plantas utilizadas neste trabalho.

Número de Voucher	Nome científico	Nome comum	Origem
LISI 8/2011	<i>Echinopartum ibericum</i> Rivas Mart., Sánchez-Mata & Sancho	Caldoneira	Autóctone (Endemismo Ibérico - Habitat 4090) *
LISI 9/2011	<i>Pterospartum tridentatum</i> (L.) Willk subsp. <i>cantabricum</i> (Spach) Talavera & P. E. Gibbs	Carqueja	Autóctone
LISI 10/2011	<i>Juniperus communis</i> L. subsp. <i>alpina</i> (Suter) Celak.	Zimbro	Autóctone (Exclusivo do Setor Estrelense - Habitat 4060) *
LISI 11/2011	<i>Ruscus aculeatus</i> L.	Gilbardeira	Autóctone (Anexo V da Diretiva Habitats) *
LISI 12/2011	<i>Rubus ulmifolius</i> Schott	Silvas	Autóctone
LISI 13/2011	<i>Hakea sericea</i> Schrader	Carapeteiro	Austrália e Tasmânia (Não indígena, exótica e invasora) #
LISI 14/2011	<i>Cytisus multiflorus</i> (L'Hér) Sweet	Giesta-Branca	Autóctone (Endemismo Ibérico)
LISI 15/2011	<i>Crataegus monogyna</i> Jacq.	Pilriteiro	Autóctone
LISI 16/2011	<i>Erica arborea</i> L.	Urze-Branca	Autóctone
LISI 18/2011	<i>Ipomoea acuminata</i> (Vahl) Roemer & Schultes	Bons-Dias	Região Tropical (Não indígena, exótica e invasora) #
LISI 19/2011	<i>Ailanthus altissima</i> (Miller) Swingle	Árvore-do-Céu	China (Não indígena, exótica e invasora) #

As plantas assinaladas com * são características de habitats da Diretiva Habitats e portanto são espécies a salvaguardar em áreas classificadas e com restrições à sua colheita, no entanto na Resolução do Conselho de Ministros N.º 83/2009 de 9 de setembro, na Alínea b) do Artigo 7º existe uma exceção à realização de ações de âmbito científico, o que, conjugado com a Alínea l) do N.º 2 do Artigo 8º, é um ato sujeito a autorização do Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade (atual Instituto da Conservação da Natureza e das Florestas), ao abrigo do Plano de Ordenamento do Parque Natural da Serra da Estrela. A autorização para a colheita das espécies autóctones inscritas na Diretiva Habitats foi devidamente concedida e encontra-se em Anexo.

A detenção de materiais recolhidos das espécies assinaladas com # (espécies identificadas como exóticas e invasoras) está sujeita a uma licença de detenção, assim como o seu transporte está condicionado ao abrigo do Decreto-Lei N.º 565/99 de 21 de dezembro, no estabelecido no Ponto 2 do Artigo 8º, como forma de prevenir a possibilidade de introdução ou repovoamento através de evadidos. A licença de detenção e a autorização para transporte destas espécies foram legalmente atribuídas e encontram-se em Anexo.

Anexo 1



Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade, I.P.

UNIDADE DE APLICAÇÃO DE CONVENÇÕES INTERNACIONAIS

Rua de Santa Marta, 55
1169-230 Lisboa
Portugal

T. +351.213 507 900
F. +351.213 507 984
icnb@icnb.pt
www.icnb.pt



Ministério do Ambiente e
do Ordenamento do Território

DATA S. COMUNICAÇÃO DATA
23-05-2011

Exmo. Sr.
Ângelo Filipe Santos Luís
Rua do Pio, N.º 15, 2º Dt.º Gibraltar
6200-693 Teixoso

S. REFERÊNCIA

I.C.N.B.	SAÍDAS
27 MAIO 2011	
PROC.º Ofício - 9223 / 2011 / UACI	

N. REFERÊNCIA

REFERÊNCIA INTERNA

ASSUNTO

Autorizações para recolha de amostras e declaração de detenção de espécimes de espécies não indígenas

Junto se envia a declaração de detenção solicitada por V. Exa.

Relativamente à autorização para recolha de amostras das espécies autóctones e não indígenas no Parque Natural da Serra da Estrela, levando em consideração o estipulado na alínea l) do n.º 2 do artigo 8º e a alínea a) do n.º 2 do artigo 36º do Regulamento do Plano de Ordenamento do Parque Natural da Serra da Estrela (Resolução do Conselho de Ministros n.º83/2009 de 9 de Setembro), emite-se parecer positivo à colheita de amostras de material vegetal por parte do Dr. Ângelo Filipe Santos Luís no âmbito de trabalhos de investigação que está a desenvolver. Esta colheita deverá ser realizada de forma a não comprometer a sobrevivências das plantas e apenas na estrita necessidade de material biológico para o fim pretendido.

Com os melhores cumprimentos,

O Director do Departamento de Conservação e Gestão de Biodiversidade
(por delegação de competências – Despacho nº 9/PRES/2011, de 21 de Fevereiro)



(Mário Silva)

Anexo 2

ICNB

Instituto da Conservação da Natureza e da Biodiversidade, I.P.

UNIDADE DE APLICAÇÃO DE CONVENÇÕES INTERNACIONAISRua de Santa Marta, 55
1169-230 Lisboa
PortugalT. +351.213 507 900
F. +351.213 507 984
icnb@icnb.pt
www.icnb.ptMinistério do Ambiente
e do Ordenamento do
Território

DECLARAÇÃO PROVISÓRIA N.º 11PT 0001/EX/S

Ângelo Filipe Santos Luís, aluno de doutoramento em Bioquímica na Universidade da Beira Interior, está autorizado, sem prejuízo do cumprimento de outra legislação em vigor e no âmbito da sua tese de Doutoramento "Pesquisa e Identificação de Compostos Bioactivos em Plantas Florestais", a deter e transportar espécimes de espécies não indígenas, ao abrigo do estipulado no n.º 1, do artigo 9.º do Decreto-Lei n.º 565/99, de 21 de Dezembro, de acordo com a excepção prevista no n.º 4, do artigo 8.º do referido Dec.-Lei.

Conforme referido no n.º 1 do artigo 10.º, deste diploma legal, a detenção e transporte têm de possuir as condições de segurança adequadas às espécies: *Hakea sericea*, *Ailanthus altissima* e *Ipomoea indica*.

Lisboa, 11, de Maio de 2011

O Coordenador da Unidade de Aplicação de Convenções Internacionais
(por sub-delegação de competências – Despacho n.º 1/DCGB/2011, de 30 de Março)



