

**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



**Avaliação da bioatividade da espécie mediterrânica  
*Juniperus sp.***

**Raquel Morgado Anjos**

**Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas**

**2017**

**Universidade de Lisboa  
Faculdade de Farmácia**



**Avaliação da bioatividade da espécie mediterrânica  
*Juniperus sp.***

**Raquel Morgado Anjos**

**Monografia de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas  
apresentada à Universidade de Lisboa através da Faculdade de Farmácia**

**Orientador: Professora Doutora Ana Cristina F. da Conceição Ribeiro**

**2017**

## Resumo

Desde os tempos mais ancestrais que se faz uso das plantas para o tratamento de doenças, havendo evidência dessa mesma utilização com mais de 5000 anos. Por isso, o contínuo estudo de plantas é do maior interesse ao nível da descoberta de novos fármacos.

Ao longo deste trabalho vão ser estudadas quatro espécies pertencentes ao género *Juniperus*, sendo estas, o *Juniperus communis*, o *Juniperus oxycedrus*, o *Juniperus phoenicea* e o *Juniperus thurifera*. Vão ser descritas as bioatividades apresentadas por estas espécies, discriminando a atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, atividade anti-inflamatória, atividade herbicida, atividade gastro-protetora, atividade neuroprotetora, atividade hipoglicemiante e atividade antitumoral.

A subespécie mais promissora demonstra ser o *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e por isso são descritos alguns trabalhos laboratoriais que demonstraram o seu potencial antitumoral nas células tumorais do cancro do cólon, HT-29.

**Palavras-chave:** *Juniperus*; bioatividades; lectinas; antitumoral.

## **Abstract**

Since the ancient times that plants are used for the treatment of diseases, with evidence of more than 5000 years. Therefore, the study of plants is still of great interest in terms of drug discovery.

Throughout this work, will be studied four species belonging to the genus *Juniperus*, these being, *Juniperus communis*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus phoenicea* and *Juniperus thurifera*. Will be described the bioactivities presented by these species, discriminating the antimicrobial activity, antioxidant activity, anti-inflammatory activity, herbicide activity, gastro-protective activity, neuroprotective activity, hypoglycemic activity and antitumor activity.

The most promising subspecies is the *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* and so are described some laboratorial work that demonstrated the antitumor potential in tumor cells of colon cancer, HT-29.

**Keywords:** *Juniperus*; bioactivities; lectins; antitumor.

## **Agradecimentos**

Quero, em primeiro lugar, agradecer à Professora Ana Cristina por toda a ajuda, compreensão e tempo despendido na elaboração, não só neste trabalho escrito, mas também ao longo do trabalho de laboratório desenvolvido na disciplina de Projeto III, em parte, também contemplado nesta monografia.

Agradeço também aos meus pais, à minha irmã e ao meu namorado que sempre estiveram presentes e me deram todo o apoio necessário para concluir este curso.

Às minhas colegas e amigas que a faculdade me deu, Sofia Fernandes, Ana Margarida, Madalena Matos, Joana Faria e Mafalda Costa, porque sem elas teria sido muito mais difícil estudar para todos os exames.

<b>Índice</b>	
<b>Resumo</b> .....	- 3 -
<b>Abstract</b> .....	- 4 -
<b>Agradecimentos</b> .....	- 5 -
<b>Índice</b> .....	- 6 -
<b>Índice de figuras</b> .....	- 8 -
<b>Índice de Tabelas</b> .....	- 9 -
<b>1. Introdução</b> .....	- 10 -
<b>1.1. Interesse histórico das plantas e aplicações medicinais</b> .....	- 10 -
<b>2. Objetivos</b> .....	- 11 -
<b>3. Métodos</b> .....	- 12 -
<b>4. Desenvolvimento do tema</b> .....	- 12 -
<b>4.1. Género <i>Juniperus</i>. Caracterização geral das espécies</b> .....	- 12 -
4.1.1. Secção <i>Juniperus</i> .....	- 12 -
4.1.1.1. <i>Juniperus communis</i> .....	- 12 -
4.1.1.2. <i>Juniperus oxycedrus</i> .....	- 14 -
4.1.2. Secção <i>Sabina</i> .....	- 15 -
4.1.2.1. <i>Juniperus phoenicea</i> .....	- 15 -
4.1.2.2. <i>Juniperus thurifera</i> .....	- 17 -
<b>4.2. Emprego etnobotânico</b> .....	- 18 -
<b>4.3. Bioatividades gerais</b> .....	- 19 -
4.3.1. Atividade antioxidante .....	- 19 -
4.3.2. Atividade antimicrobiana .....	- 21 -
4.3.3. Atividade anti-inflamatória .....	- 22 -
4.3.4. Atividade herbicida .....	- 23 -
4.3.5. Atividade gastro protetora .....	- 23 -
4.3.6. Atividade neuroprotetora .....	- 24 -
4.3.7. Atividade hipoglicemiante .....	- 25 -
4.3.8. Atividade antitumoral .....	- 26 -

<b>4.4. Avaliação do potencial antitumoral da subespécie <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i></b> .....	- 32 -
4.4.1. Lectinas v.s. bioatividade.....	- 32 -
4.4.1.1. Estrutura.....	- 33 -
4.4.1.2. Centro de ligação ao hidrato de carbono .....	- 35 -
4.4.1.3. Classificação .....	- 36 -
4.4.1.4. Funções biológicas das lectinas .....	- 37 -
4.4.1.5. Mecanismo de ação antitumoral das lectinas .....	- 38 -
4.4.2. Avaliação da atividade de lectina em folhas da subespécie <i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i> .....	- 40 -
<b>5. Conclusão</b> .....	- 42 -
<b>6. Referências bibliográficas</b> .....	- 44 -

## Índice de figuras

<b>Figura 1</b> – <i>Juniperus communis</i> . .....	- 13 -
<b>Figura 2</b> – Distribuição geográfica da espécie <i>Juniperus communis</i> . .....	- 13 -
<b>Figura 3</b> – <i>Juniperus oxycedrus</i> . .....	- 14 -
<b>Figura 4</b> – Distribuição geográfica da espécie <i>Juniperus oxycedrus</i> . .....	- 15 -
<b>Figura 5</b> – <i>Juniperus phoenicea</i> . .....	- 16 -
<b>Figura 6</b> – Distribuição geográfica da espécie <i>Juniperus phoenicea</i> . .....	- 16 -
<b>Figura 7</b> – <i>Juniperus thurifera</i> . .....	- 17 -
<b>Figura 8</b> – Distribuição geográfica da espécie <i>Juniperus thurifera</i> . .....	- 18 -
<b>Figura 9</b> – Monómero de lectina de leguminosa. ....	- 34 -
<b>Figura 10</b> – Dímeros de lectinas de leguminosas e o tetrâmero da aglutinina de amendoim. ....	- 35 -
<b>Figura 11</b> – As lectinas de plantas induzem a morte celular das células tumorais via morte celular programada. ....	- 40 -

## Índice de Tabelas

<b>Tabela 1</b> – Quadro resumo das bioatividades de cada espécie do género <i>Juniperus</i> . .....	- 29 -
<b>Tabela 2</b> – Quantidade de lectinas presentes em algumas espécies de plantas ....	- 33 -
<b>Tabela 3</b> – Classificação das lectinas de plantas baseada na evolução genética de famílias .....	- 37 -

## 1. Introdução

### 1.1. Interesse histórico das plantas e aplicações medicinais

O emprego de plantas medicinais, no tratamento de doenças, é tão antigo como a própria humanidade. A mais antiga evidência escrita do uso de preparações à base de plantas com fins terapêuticos data de aproximadamente 5000 anos, tendo sido encontrada em Nagpur (Índia), fazendo referência a mais de 250 plantas. O Papiro de Ebers, escrito em 1550 a. C., refere a utilização terapêutica de mais de 700 plantas de diferentes espécies, muitas delas utilizadas nos dias de hoje, sendo exemplo a romã, o rícino, o aloé, o sene, o alho, a cebola, o figo, o salgueiro, o coentro, o zimbro, o centauro comum, entre outras (1).

No início do século XIX ocorreu um ponto de viragem no conhecimento e no uso das plantas medicinais. A descoberta, o estudo e o isolamento de substâncias ativas como taninos, saponinas, vitaminas e hormonas, provenientes de plantas marcou o início da farmácia científica (1).

A sociedade atual tem uma preocupação crescente e constante com a promoção da saúde e prevenção da doença, através do recurso a produtos naturais, que se encontram bastante acessíveis ao público em geral, seja em locais especializados e com um grande nível de credibilidade associado, como as farmácias, seja em supermercados ou parafarmácia (2). Esta situação leva, grande parte das vezes, à aquisição de suplementos alimentares à base de plantas para atingir esse objetivo. O consumo de suplementos alimentares em Portugal tem vindo a aumentar nas últimas décadas, representando cerca de 4% do valor de vendas das farmácias (2,3).

Existem assim vários produtos, suplementos alimentares ou não, disponíveis no mercado farmacêutico, em que são utilizadas plantas medicinais, sendo exemplo:

- ***Arnica montana* L.** (flor): está presente essencialmente em cremes e pomadas e tem um grande potencial anti-inflamatório e analgésico, sendo por isso utilizada em situações de contusões, hematomas, edemas, entre outras (4,5). São exemplo de produtos no mercado o Arnigel® (Boiron) e o Cicabio arnica+® (Bioderma) (6,7).
- ***Centella asiática* L. Urban** (folha): funciona como anti-celulítico (8), tem efeitos ao nível da microcirculação (9), da memória e das funções cognitivas (10). Como exemplos de produtos temos a Gotu kola® gel/comprimidos (Calêndula) e Gotu kola® (Solgar) (6,7,11).
- ***Echinacea purpúrea* L. Moench** (raiz/planta): é bastante conhecida por participar nas defesas naturais do organismo e reforço do sistema imunitário (12); também auxilia na funcionalidade das vias urinárias (13) e respiratórias

- (14). Disponíveis no mercado estão os produtos Echinaforce® (A.Vogel) e Junior Echinacea xarope® (Tilman) (6,7,11).
- ***Ginkgo biloba* L.** (folha): existem no mercado vários suplementos alimentares como é o caso do Cerebrum Ginkgo biloba® (Natiris) e até medicamentos à base desta planta, por exemplo, Biloban® 40 e 80 mg (Atral) (6,7,11), que é muitas vezes prescrito por médicos. Esta planta tem propriedades antioxidantes (15), atua ao nível da memória (16) e da função cognitiva (17), e contribui para uma normal circulação do sangue e microcirculação (18).
  - ***Panax ginseng* C. A. Meyer** (folha/raiz): tem propriedades antioxidantes (19) e é um potente estimulante físico (20) e mental (21). Participa também no metabolismo dos hidratos de carbono (22). Existem vários produtos no mercado com ginseng na sua composição, nomeadamente, Geleia Real + Energia® (Arkoreal) e Ginseng – Tónico® (Ortis) (6,7,11).
  - ***Serenoa repens* (W. Bartram) Small** (fruto): Esta planta está indicada no tratamento sintomático da hiperplasia benigna da próstata (23,24), havendo, entre outros produtos, um medicamento no mercado com a sua composição (Permixon® - Pierre Fabre (6,7,11)).
  - ***Silybium marianum* L. Gaertn** (fruto/semente): esta planta tem uma vasto conjunto de aplicações nomeadamente a nível da função digestiva, hepática (25), é também antioxidante (26) e, participando ainda, no metabolismo dos hidratos de carbono. No mercado, existe por exemplo o Chologutt® (Korangi), que tem outras plantas associadas na sua composição, e ainda o Advancis Hepa® (Farmodiética), entre outros (6,7,11).
  - ***Valeriana officinalis* L.** (raiz): o extrato da raiz de valeriana é muito usado no tratamento de perturbações do sono associadas ao stress (27,28). No mercado existem vários produtos com este extrato, alguns deles medicamentos, como é o caso do Livetan 500 mg® (Grunenthal) e do Valdispert® (Vemedica) (6,7,11).

Assim, o estudo das mais variadas espécies de plantas continua, nos dias de hoje, a ter um papel importante na investigação e procura de novos fármacos para a prevenção, tratamento e cura das mais variadas patologias como: tumoral, reumática e inflamatória.

## 2. Objetivos

Esta revisão bibliográfica tem como principal objetivo aprofundar os conhecimentos relativos às bioatividades de várias espécies mediterrânicas de *Juniperus* sp.. Foram

selecionadas quatro espécies para o estudo realizado: *Juniperus communis*, *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus phoenicea* e *Juniperus thurifera*, sendo que todas elas são endêmicas de Portugal exceto o *Juniperus thurifera*.

Para além deste objetivo vão também ser descritos alguns trabalhos realizados, por mim, na disciplina de projeto III e no Mestrado em Controlo, Qualidade e Toxicologia Alimentar, reveladores da atividade antitumoral do *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, mediada por lectinas.

### **3. Métodos**

Para a realização desta monografia foram utilizadas como fontes de pesquisa bibliográfica as plataformas eletrónicas pubmed e b-on. Foram consultadas um total de 74 referências bibliográficas a maioria das quais artigos científicos, mas também plataformas *online* importantes para o tema desenvolvido.

### **4. Desenvolvimento do tema**

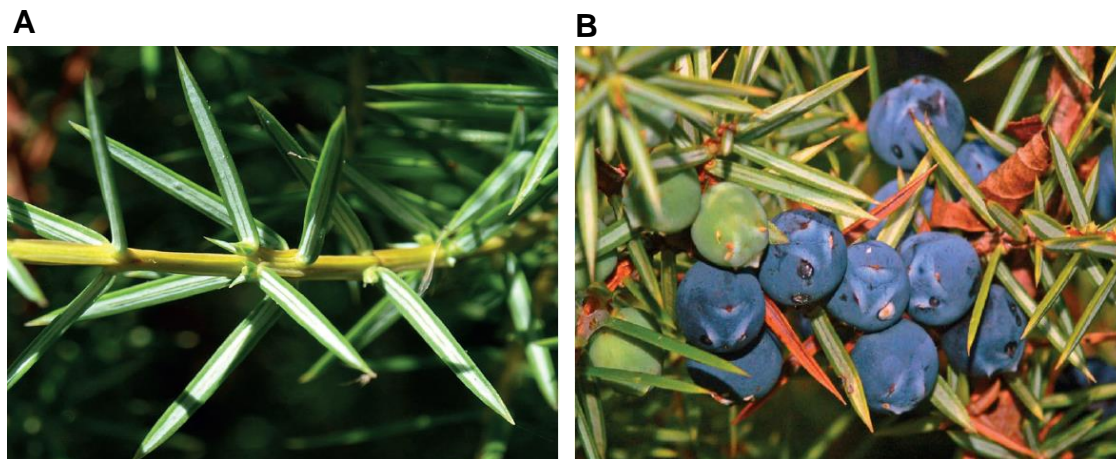
#### **4.1. Género *Juniperus*. Caracterização geral das espécies**

O género de plantas *Juniperus* pertence à família das *Cupressaceae* (29) e distingue-se das outras Cupressáceas pelas gábulas crassas com sementes ovóides e ápteras. Este género, constituído por árvores ou arbustos monóicos ou dióicos perenes com folhas isomorfas ou dimorfas, compreende cerca de sessenta espécies com distribuição restrita ao hemisfério norte, com exceção do *Juniperus procera*, cuja ocorrência se estende também ao hemisfério sul. O género engloba três secções, a secção *Caryocedrus* (representada apenas por *Juniperus drupácea*); a secção *Juniperus* (= *Oxycedrus*), que inclui nove ou dez espécies, sendo os mais representativos: *Juniperus communis* subsp. *hemisphaerica*, *Juniperus communis* subsp. *alpina*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e *Juniperus navicularis* -; e secção *Sabina* que inclui cerca de cinquenta espécies – sendo o *Juniperus phoenicea* subsp. *phoenicea* alvo desta revisão (30).

#### **4.1.1. Secção *Juniperus***

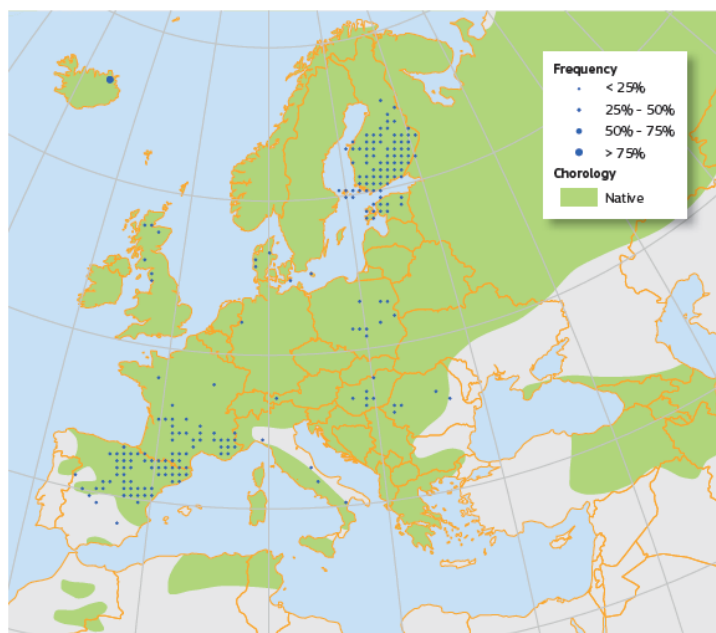
##### **4.1.1.1. *Juniperus communis***

A espécie *Juniperus communis* é um arbusto dióico, prostrado ou com ramos mais ou menos ascendentes. As folhas têm 10 a 15 mm de comprimento e 1,3 a 2 mm de largura, encurvadas, densas, agudas ou obtusas, mucronadas, com uma faixa estomática, na página inferior, muito larga. As gábulas maduras são azulada-escuras, raramente acastanhadas, pruinosas (**Figura 1**) (30,31).



**Figura 1 – *Juniperus communis*.** (A) Folhas com faixas estomáticas brancas e (B) gálbulas. (adaptado de Enescu *et al.*, 2016 (32)).

O *Juniperus communis* é de todas as espécies de *Juniperus* aquela que apresenta a mais alargada distribuição geográfica e é também a que pode ser encontrada mais a norte do planeta. Está distribuída por todo o hemisfério norte e na Europa pode ser encontrado desde a Escandinávia até ao sul de Espanha. Esta espécie cresce geralmente em locais pouco elevados, como é o caso de pastagens e de campos abandonados. No entanto, acima das montanhas siberianas pode ser encontrado em elevadas altitude (**Figura 2**). Em Portugal, a sua existência restringe-se à Serra da Estrela (acima dos 1300 metros de altitude) e à Serra do Gerês (acima dos 1100 metros de altitude). Esta espécie é vulgarmente conhecida como “zimbro” (30,32).



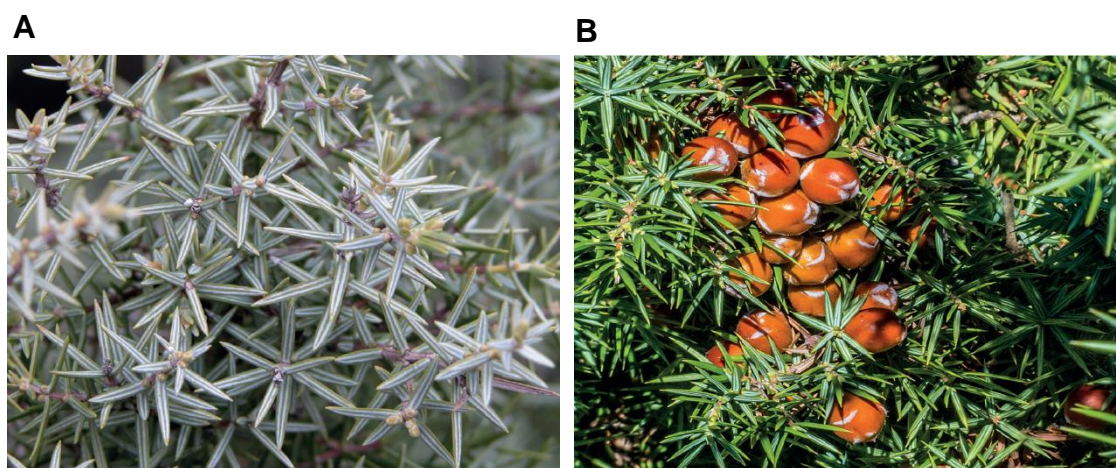
**Figura 2 - Distribuição geográfica da espécie *Juniperus communis*.** (adaptado de Enescu *et al.*, 2016 (32))

Esta espécie é típica de solos pobres e também de condições atmosféricas duras, sendo bastante tolerante ao frio e à seca, no entanto, requiere bastante luminosidade (32).

Existem, três subespécies descritas de *Juniperus communis*, que são *Juniperus communis* subsp. *communis*, *Juniperus communis* subsp. *hemisphaerica* e *Juniperus communis* subsp. *alpina* (31).

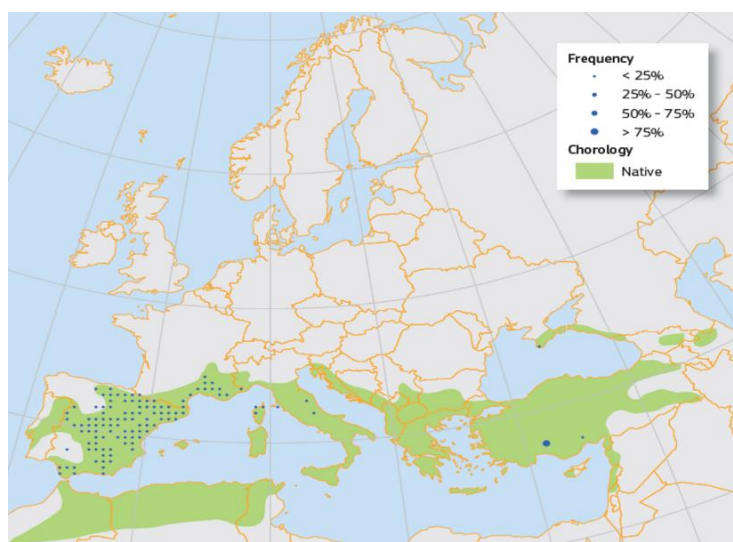
#### 4.1.1.2. *Juniperus oxycedrus*

A espécie *Juniperus oxycedrus* é um arbusto ou árvore pequena até 15 metros, dióico, com copa cônica ou ampla. Folhas com 8 a 25 mm de comprimento e espessura que pode ir de 1 a 1,5 mm, atenuadas ou mucronadas no ápice, mais ou menos pungentes, patentes, com duas faixas estomáticas brancas na página inferior. Gábulas com 8 a 15 mm de diâmetro, de globosa a piriforme, vermelha ou púrpura e escura na maturação, pruinosa ou não (**Figura 3**) (30,31).



**Figura 3 – *Juniperus oxycedrus*.** (A) Folhas com faixas estomáticas brancas e (B) gábulas. (adaptado de Vilar et al., 2016 (33))

Esta espécie é nativa de toda a região do Mediterrâneo, desde Marrocos e Portugal até ao Líbano, Síria chegando ao Irão e às montanhas do Cáucaso (**Figura 4**) (30,33). Em Portugal ocorre sobretudo em zonas de maior continentalidade em Trás-os-Montes, Nordeste da Beira Interior, Bacia do Alto-Tejo, Estremadura e Alentejo, encontra-se desde o nível do mar até aos 2200 metros de atitude (30). Cresce em solos secos e finos, e em todos os materiais rochosos (calcários, siliciosos e dunas arenosas) (33). É comumente conhecido como “cedro”, “cedro-de-Espanha”, “oxicedro”, “zimbri-oxicedro”, “zimbri-molar” ou “zimbri-bravo” (30).



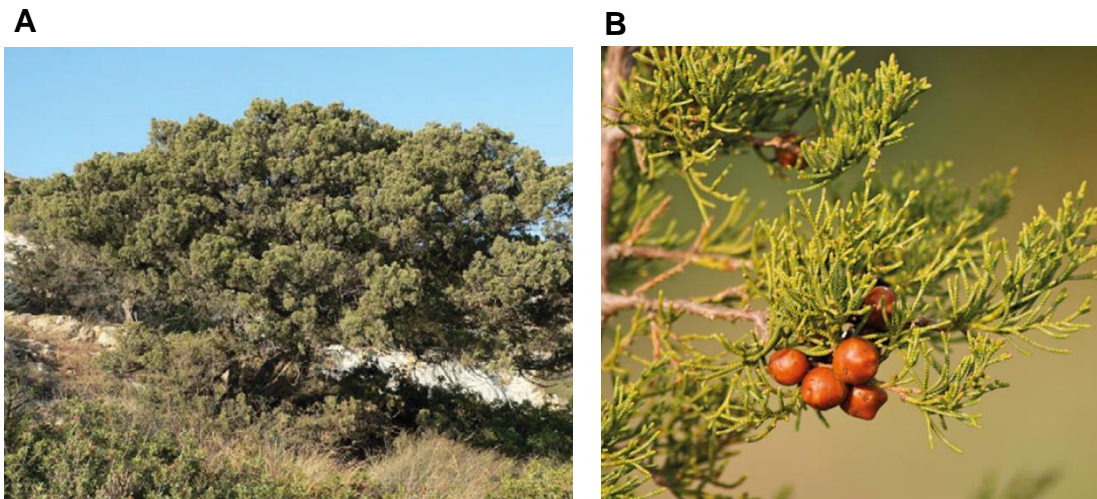
**Figura 4** - Distribuição geográfica da espécie *Juniperus oxycedrus*. (adaptado de Vilar et al., 2016 (33))

Existem 4 subespécies conhecidas de *Juniperus oxycedrus*, *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, de todos, é o que têm maior distribuição tanto nas regiões centrais como costeiras; *Juniperus oxycedrus* subsp. *macrocarpa*, comum na costa do Mediterrâneo e do Mar Negro; *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, no interior do Norte da Argélia e na Península Ibérica; e *Juniperus oxycedrus* subsp. *transtagana*, nas planícies e costas do centro de Portugal (33).

#### 4.1.2. Secção *Sabina*

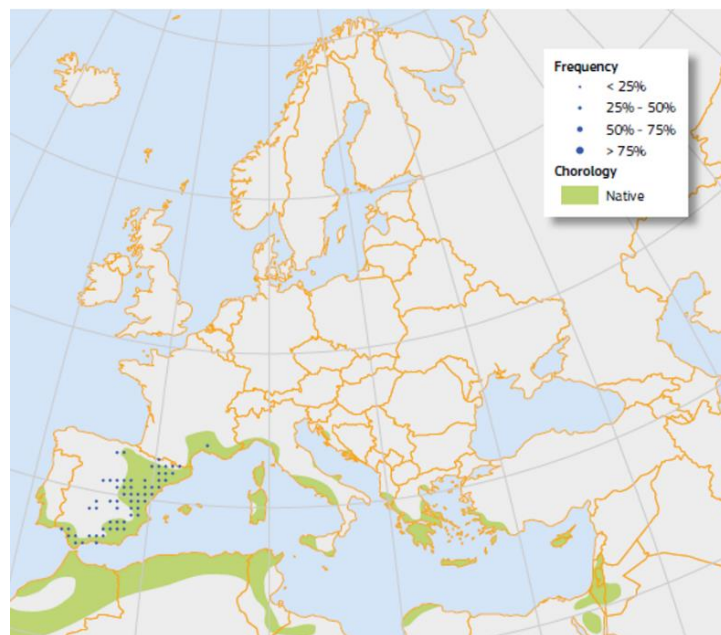
##### 4.1.2.1. *Juniperus phoenicea*

A espécie *Juniperus phoenicea* é um arbusto ou pequena árvore perene, com cerca de 7 a 8 metros de altura. O arbusto forma variadas hastes junto ao chão, enquanto que a sua forma na posição vertical é monopodial. A copa é densa, primeiro cónica começando a alargar de forma irregular, com ramos ascendentes e por vezes curvados. Nas plantas jovens as folhas são do tipo espinescentes, com cerca de 1 mm de largura e 5 a 14 mm de comprimento, com 2 bandas estomáticas por cima e por baixo. As folhas adultas alternam em pares ou trios, e são ovaladas. Esta espécie é principalmente monoica, mas também pode haver plantas dioicas. Os gálbulos têm cerca de 1 cm de diâmetro, são castanhos escuros a vermelhos, e contêm 3 a 9 sementes (**Figura 5**) (31,34) .



**Figura 5 – *Juniperus phoenicea*.** (A) Árvore, (B) folhas e gálbulos. (adaptado de Caudullo *et al.*, 2016 (34))

Esta espécie cobre toda a bacia do Mediterrâneo, desde as costas atlânticas de Portugal, o ocidente das montanhas Atlas, à Jordânia, Península do Sinai e Arábia Saudita até ao Este do mar Vermelho, ocorrendo em pequenas e dispersas populações. Também está presente nas ilhas da Madeira e Canárias (**Figura 6**). Cresce desde o nível do mar, até aos 2400 metros de altitude (34).

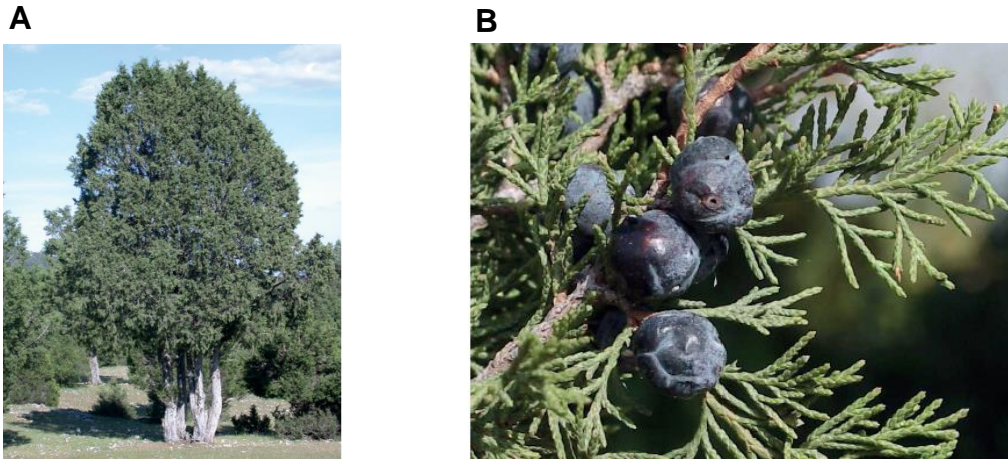


**Figura 6 - Distribuição geográfica da espécie *Juniperus phoenicea*.** (adaptado de Caudullo *et al.*, 2016 (34))

Existem 2 subespécies conhecidas de *Juniperus phoenicea*, *Juniperus phoenicea* subsp. *phoenicea*, que tem pequenas folhas obtusas, gálbulos maiores castanho-avermelhados e liberta pólen na primavera, e *Juniperus phoenicea* subsp. *turbinata*, que tem folhas mais alongadas, gálbulos castanho-ocre e liberta pólen no outono (34).

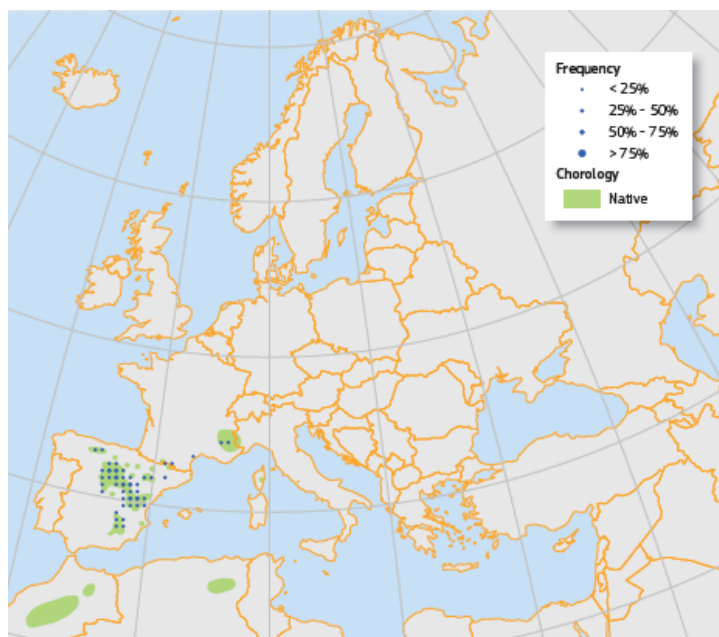
#### 4.1.2.2. *Juniperus thurifera*

A espécie *Juniperus thurifera* é um arbusto ou árvore pequena, perene, que pode atingir até 20 metros de altura, mas normalmente mede 5 a 12 metros. A copa é piramidal nas idades mais jovens e depois torna-se ampla, arredondada e muitas vezes irregular. As folhas são verde claras com cerca de 2 mm de comprimento, escamosas e cobrem completamente os ramos. É uma espécie dióica. Os gábulos têm cerca de 7 a 8 mm. São subglobosos e maduram aos 2 anos (**Figura 7**) (31,35).



**Figura 7 - *Juniperus thurifera*.** (A) Ávore (B) respetivos gábulos. (adaptado de González, *et al.*, 2016 (35))

Esta espécie é endémica do sudoeste europeu e do norte de África. A sua maior distribuição é em Espanha, mas também nos Alpes franceses, Pirinéus, Córcega e nos Alpes italianos. Também se encontram em Marrocos e na Argélia (**Figura 8**). Esta espécie não está presente em Portugal. O *Juniperus thurifera* é comumente conhecido como “Juniperus espanhol” (35).



**Figura 8** - Distribuição geográfica da espécie *Juniperus thurifera*. (adaptado de González *et al.*, 2016 (35))

#### **4.2. Emprego etnobotânico**

As plantas do género *Juniperus* são das mais utilizadas no Mundo pelos povos indígenas. Das 2582 espécies documentadas que são usadas pelos povos nativos da América do Norte a espécie *Juniperus communis* é a oitava mais frequentemente utilizada, de acordo com o número de aplicações medicinais (36). No caso desta espécie, existem relatos do seu uso, há vários séculos, como especiaria e também na medicina tradicional no tratamento de infeções oportunistas (37).

Mais generalizadamente, as várias espécies de *Juniperus* são reconhecidas por apresentarem propriedades farmacológicas, tendo como exemplos da sua aplicação, o tratamento de feridas, de dores abdominais e também de várias desordens a nível gástrico, como diarreia, doenças ginecológicas e ainda hemorroidas. Aplica-se ainda no tratamento de constipações, tosse (expetorante) e bronquite, assim como ao nível das vias urinárias, sendo utilizado no tratamento da inflamação dos rins e auxílio na eliminação dos cálculos renais (funcionando como diurético). Relativamente à área da dermatologia é aplicado no tratamento da psoríase e eczema. Tem ainda propriedades antissépticas, antivirais, anticancerígenas e abortivas (38–40).

De um modo mais específico, a espécie ***Juniperus oxycedrus*** tem descritas algumas das atividades acima enunciadas, porém é também importante referir outras, como é o caso da sua atuação ao nível do aparelho respiratório no tratamento de doenças como tuberculose, bronquite e pneumonia (41,42), havendo ainda relatos do seu uso no tratamento da obesidade (42). As **bagas** desta espécie são muito utilizadas no

tratamento de infeções urinárias e articulações calcificadas, e em associação com as folhas sendo aplicadas no tratamento de doenças parasitárias externas (39,41,42). Na Turquia, a infusão das **bagas** e das **folhas** é usada internamente no tratamento da diabetes (41). O **óleo essencial** produzido através dos **ramos** e da **madeira** desta espécie, também conhecido como óleo de cade é muito utilizado na dermatologia humana e veterinária no tratamento de eczema crónico e outras doenças de pele. Este óleo essencial tem também propriedades queratolíticas e antipruríticas (43).

Relativamente à espécie ***Juniperus phoenicea*** também está relatado o seu uso no tratamento da diabetes, diarreia e reumatismo. As **bagas** secas e na forma de pó são utilizadas na cura de ulcerações da pele e abscessos (44,45).

### **4.3. Bioatividades gerais**

O emprego etnobotânico das plantas tem no seu fundamento a presença de compostos bioativos com determinadas ações farmacológicas. No entanto, antigamente não havia conhecimentos nem técnicas para estudar estes mesmos compostos e, por isso, as plantas eram utilizadas com base no conhecimento empírico que ia passando de geração em geração. Hoje em dia, este conhecimento já é bastante aprofundado e todos os dias se descobrem novos compostos bioativos responsáveis por bioatividades, apresentadas pelas plantas, como será descrito subseqüentemente.

#### **4.3.1. Atividade antioxidante**

Os estudos epidemiológicos demonstram uma clara relação inversa entre o consumo de alimentos ricos em antioxidantes e o aparecimento de várias doenças relacionadas com o stress oxidativo. Os antioxidantes mais comumente utilizadas na indústria alimentar e farmacêutica são o hidroxianisole butilado (BHA), o hidroxituloeno butilado (BHT), o *tert*-butilhidroquinona (TBHQ) e o galato de propilo (PG), no entanto estes antioxidante sintéticos apresentam riscos para a saúde dos consumidores (39). Assim, a investigação tem procurado novos antioxidantes, de origem natural, que não apresentem quaisquer efeitos secundários na saúde humana. As famílias dos ácidos fenólicos, flavonóides e taninos são conhecidos pelos seus benefícios antioxidantes (46).

A atividade antioxidante para a espécie ***Juniperus communis*** (**Tabela 1**) foi analisada utilizando o **óleo essencial** produzido através das **bagas** desta espécie. A composição deste óleo foi analisada e os seus componentes principais são hidrocarbonetos monoterpénicos (80,4%) e hidrocarbonetos sesquiterpénicos (9,6%) (37). Foram realizados vários ensaios para a avaliação da atividade antioxidante desta espécie tendo como controlo positivo o BHT. Esta avaliação fez-se por: método do DPPH; método do

ABTS; medição da capacidade quelante do radical hidroxilo (OH<sup>•</sup>); e medição da capacidade sequestradora de eletrões do radical superóxido (<sup>•</sup>O<sub>2</sub><sup>-</sup>), associado ao efeito inibitório da xantina oxidase.

O **método do DPPH** avaliou a capacidade dos componentes do **óleo essencial** das **bagas** de *Juniperus communis* atuarem como dadores de átomos de hidrogénio. Este ensaio revelou um potencial redutor fraco por parte do óleo essencial apresentando um IC<sub>50</sub> elevado (34,80mg/mL), em comparação com o controlo positivo BHT (IC<sub>50</sub> = 4,414 mg/mL) (37). O método do ABTS analisa a formação do radical de mioglobina férrica através de metahemoglobina e peróxido de hidrogénio que oxida o ABTS produzindo o catião radicalar ABTS<sup>•+</sup>. Os antioxidantes suprimem a produção do catião radicalar de um modo concentração dependente com diminuição da coloração de um modo proporcional. Este ensaio revelou um efeito inibitório significativo, com uma correspondente IC<sub>50</sub> = 10,96 µg/mL, mas o BHT (controlo positivo) é mais inibitório (IC<sub>50</sub> = 0,0175 µg/mL) (37). Relativamente à capacidade sequestrante dos radicais superóxido, o **óleo essencial** em estudo apresentou um valor de IC<sub>50</sub> de 0,822 µg/mL (37).

Neste estudo observaram-se assim, diferentes mecanismos para a atividade antioxidante apresentada pelo óleo essencial desta espécie (37).

Para a espécie *Juniperus oxycedrus* (**Tabela 1**) foram realizados vários estudos que avaliaram a atividade antioxidante de diferentes tipos de extratos e também para diferentes subespécies. Nomeadamente, para as subespécies *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* e *Juniperus oxycedrus* subsp. *macrocarpa* foi estudado o **extrato metanólico** das **bagas** através de quatro ensaios diferentes, o ensaio do DPPH, o ensaio da avaliação do poder redutor, o ensaio que avalia a atividade quelante do ião Fe<sup>2+</sup> e o teste do TBA. Este estudo concluiu que o extrato metanólico das bagas de ambas as subespécies apresentam propriedades antioxidantes para os diferentes ensaios testados, sendo que a subespécie *Juniperus oxycedrus* subsp. *macrocarpa* apresentou uma maior atividade no ensaio do DPPH e no teste do TBA, contrariamente ao ensaio da avaliação do poder redutor e ao ensaio da atividade quelante do ião Fe<sup>2+</sup> que foi a subespécie *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* que apresentou melhores resultados. No entanto, em todos os ensaios realizados a atividade antioxidante do extrato metanólico, foi sempre inferior ao controlo positivo utilizado (39).

Ainda para a subespécie *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* foram testados os **óleos essenciais** da **madeira** e das **bagas** através do ensaio do DPPH. O óleo essencial da madeira obteve um valor de IC<sub>50</sub> de 1,45 µg/mL enquanto que o óleo essencial das bagas obteve um valor de IC<sub>50</sub> de 7,42 µg/mL, tendo por isso o óleo essencial da madeira maior atividade antioxidante que o óleo essencial das bagas (47).

O controlo positivo utilizado foi o ácido ascórbico obtendo-se um valor de IC<sub>50</sub> de 0,002mg/mL.

Foram também realizados estudos com o **extrato aquoso** das **folhas** para as espécies ***Juniperus oxycedrus***, ***Juniperus phoenicea*** e ***Juniperus thurifera***. Os ensaios realizados foram o ensaio do DPPH, o ensaio da atividade antioxidante equivalente do Trolox e o ensaio do poder redutor. Tal como para o extrato metanólico das bagas, este estudo também demonstrou atividade antioxidante para o extrato aquoso das três espécies analisadas, sendo os melhores resultados obtidos para a espécie *Juniperus oxycedrus* os mais baixos para a espécie *Juniperus phoenicea*. Estes extratos apresentaram ser também menos efetivos que os controlos positivos utilizados, BHT, quercetina e Trolox (46).

Relativamente à espécie ***Juniperus phoenicea*** (**Tabela 1**) foi realizado um estudo que avaliou a atividade antioxidante do **óleo essencial** das **folhas** e das **bagas**, assim como dos **extratos** de acetato de etilo, de diclorometano, de etanol e de metanol das **folhas** e das **bagas**, através do método do DPPH. Com este método obteve-se uma baixa atividade antioxidante para os óleos essenciais em estudo com um valor de IC<sub>50</sub> de 5364 mg/L e 14716 mg/L para o óleo essencial das folhas e bagas, respetivamente, o que pode ser explicado pela elevada concentração de hidrocarbonetos terpénicos dos óleos essenciais. Quanto aos extratos, a atividade antioxidante do **extrato metanólico** das **folhas** foi superior a todas as amostras testadas (IC<sub>50</sub>=8,5 mg/L), seguido do **extrato etanólico** das **folhas** (IC<sub>50</sub>=49,1 mg/L). Para esta espécie pode então concluir-se que a atividade antioxidante das folhas é superior à das bagas e à dos óleos essenciais, sendo que se obteve um valor de IC<sub>50</sub> aproximado ao do controlo positivo (ácido ascórbico) (45).

#### 4.3.2. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana da espécie ***Juniperus oxycedrus*** (**Tabela 1**) foi avaliada através do estudo do **extrato aquoso e metanólico** da planta. Os testes realizados foram o ensaio da difusão em placas e o ensaio da microdiluição. Avaliou-se a concentração mínima inibitória (c.m.i.) e a concentração mínima bactericida (c.m.b.). Testaram-se 178 culturas pertencentes a 56 espécies bacterianas e 5 espécies de fungos. Relativamente ao **extrato aquoso**, este, não demonstrou qualquer atividade antimicrobiana para qualquer isolado testado. No entanto, no que respeita aos resultados do **extrato metanólico**, obteve-se inibição do crescimento em 11 de 23 isolados de leveduras (*C. albicans*) e em 57 isolados de 178 estirpes de 24 espécies de bactérias (*Acinetobacter calcoaceticus*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus atrophaeus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus circulans*, *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus*

*macerans*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus sphaericus*, *Bacillus subtilis*, *Brevundimonas diminuta*, *Brucella abortus*, *Enterobacter agglomerans*, *Enterobacter pyrinus*, *Escherichia coli*, *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas putida*, *Pseudomonas syringae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, e *Xanthomonas campestris*. Estes resultados sugerem que o **extrato metanólico** da espécie ***Juniperus oxycedrus*** tem compostos com atividade antibacteriana e anticandida que podem ser utilizados como agentes antimicrobianos na terapêutica das doenças infecciosas (48).

Para a espécie ***Juniperus phoenicea*** (Tabela 1) foi avaliada a atividade antimicrobiana do **óleo essencial** das **folhas** e das **bagas**, assim como dos **extratos** de acetato de etilo, de diclorometano, de etanol e de metanol das **folhas** e das **bagas**, através do teste de difusão em placas. Foram testadas 6 bactérias, 3 Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*) e 3 Gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*); 1 levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) e, 2 fungos (*Mucor ramannianus* e *Aspergillus westerdijkiae*). Relativamente aos óleos essenciais, estes, demonstraram atividade antimicrobiana razoável para todos os microrganismos testados, sendo que, o **óleo essencial** das **folhas** apresentou maior atividade antimicrobiana que o **óleo essencial** das **bagas**, provavelmente pela maior quantidade de sesquiterpenos presente na sua composição.

Para os extratos, o **extrato metanólico** das **folhas** e das **bagas** demonstrou ter a maior atividade. Para as bactérias Gram-positivas, a espécie mais sensível foi o *B. subtilis*, sendo que a *L. monocytogenes* demonstrou ser resistente a todas as amostras. Das bactérias Gram-negativas, a espécie mais sensível foi a *P. aeruginosa* e as espécies *E. coli* e *K. pneumoniae* demonstraram ser resistentes a todas as amostras. No caso dos fungos, a atividade mais elevada foi demonstrada com o extrato etanólico das bagas para a espécie *M. ramannianus* (45).

Os estudos para avaliação da atividade antimicrobiana da espécie ***Juniperus thurifera*** (Tabela 1), utilizaram 23 compostos puros (sesquiterpenos) isolados a partir do **óleo essencial** da **madeira** e foi mensurado através do método da microdiluição. Foram testados uma seleção de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e leveduras não havendo nenhum composto que se tenha demonstrado efetivo contra qualquer uma das leveduras testadas *S. cerevisiae*, *C. albicans* e *C. neoformans*. A atividade mais elevada foi identificada para os compostos  $\alpha$ - e  $\beta$ -cedreno e sesquiterpenos (49).

#### 4.3.3. Atividade anti-inflamatória

Para estudar a atividade anti-inflamatória realizou-se um estudo que utilizou diferentes espécies e subespécies de ***Juniperus*** (Tabela 1): *J. communis* subsp. *communis*, *J.*

*communis* subsp. *saxatilis*, *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus*, e *J. oxycedrus* subsp. *macrocarpa*. Utilizaram-se como órgãos das plantas os **caules**, as **bagas** e as **folhas** das quais foram feitos **extratos aquosos e metanólicos**. Realizaram-se dois métodos, o modelo do edema da pata traseira induzido pela carragenina e o modelo do edema da pata induzido pela PGE<sub>2</sub>. Os dois métodos resultaram em valores de padrão semelhante em que se verificou uma notável inibição do edema da pata para os extratos metanólicos das bagas e folhas das espécies *J. oxycedrus* subsp. *oxycedrus* e *J. communis* subsp. *saxatilis* (50).

#### 4.3.4. Atividade herbicida

A inibição da germinação de ervas e crescimento de sementes por extratos de plantas e óleos essenciais está documentado (42). Para a subespécie ***Juniperus oxycedrus* subsp. *macrocarpa* (Tabela 1)**, foi estudada a composição do **óleo essencial** das **folhas** e a sua capacidade de inibir a germinação de ervas daninhas e o crescimento das sementes das espécies *Phalaris paradoxa*, *Trifolium campestre* e *Lolium rigidum*. Na composição do óleo essencial da subespécie em estudo foram identificados 41 compostos sendo que 61% eram monoterpenos (composto maioritário é o  $\alpha$ -pineno) e 29% eram sesquiterpenos (composto maioritário é o z-cariofileno). A atividade foi avaliada de dois modos diferentes, por contacto direto e por via aérea, sendo testadas várias dosagens. Os resultados obtidos foram promissores, uma vez que, o óleo essencial inibiu significativamente a germinação das ervas e o crescimento das sementes de todas as espécies testadas de um modo dose-dependente. Ou seja, a dose mais elevada testada (10 mg/caixa de Petri) foi aquela com que se obtiveram melhores resultados. Ocorreu inibição total tanto da germinação das ervas como do crescimento das sementes, quando aplicado por contacto direto, e por via aérea a germinação das ervas foi reduzida para 8,33, 35 e 36,6% para as espécies *L. rigidum*, *P. paradoxa* e *T. campestre*, respetivamente; e inibição do crescimento das sementes para 58, 33 e 70% para as mesmas espécies (42).

#### 4.3.5. Atividade gastro protetora

As úlceras gástricas são uma patologia multifatorial muito comum na população, sendo resultado de um descontrolo entre os fatores agressivos e protetores. Os tratamentos mais utilizados são os que inibem a secreção do ácido gástrico pelo bloqueio dos recetores H<sub>2</sub>, os inibidores da bomba de prótons (omeprazol), entre outros. O **óleo essencial** das **folhas** da espécie ***Juniperus phoenicea* (Tabela 1)**, foi avaliado para determinar a sua atividade gastro protetora nas úlceras gástricas induzidas por HCl/etanol em ratos. O tratamento foi realizado com diferentes doses de óleo essencial

(50, 75 e 100 mg/kg) e verificou-se que causou uma redução dose-dependente nas lesões gástrica induzidas pelo HCl/etanol, comprovado pela observação dos resultados histológicos. Os ratos foram divididos em diferentes grupos. No grupo dos ratos tratados com HCl/etanol e que não foram pré-tratados com nenhuma substância (grupo controle) verificaram-se lesões graves na mucosa gástrica (necrose hemorrágica). No grupo pré-tratado com omeprazol verificaram-se lesões moderadas, nomeadamente exfoliação, edema epitelial e glândulas deformadas da camada submucosa. Nos grupos tratados com diferentes doses de óleo essencial as lesões foram progressivamente menos graves ocorrendo mesmo ausência de lesões na dosagem mais elevada (100 mg/kg). Nestes grupos verificou-se uma redução da acidez gástrica, o aumento da produção de muco e a manutenção da integridade da mucosa (44).

#### 4.3.6. Atividade neuroprotetora

As **frações fenólicas** das **folhas** de várias subespécies de *Juniperus* foram caracterizadas quimicamente e posteriormente estudadas com o objetivo de avaliar a sua atividade neuroprotetora através de vários ensaios realizados. As subespécies em estudo foram *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, *Juniperus phoenicea* subsp. *phoenicea* e *Juniperus phoenicea* subsp. *turbinata* (Tabela 1). As frações fenólicas das três subespécies apresentaram composições semelhantes, tendo na sua composição compostos como catequinas, procianidinas, derivados dos flavonóides, flavonas e biflavonas. A ação de alguns destes compostos foi já descrita para as doenças neurodegenerativas. Foram realizados quatro ensaios, o ensaio da inibição da acetilcolinesterase (AChE), a avaliação do perfil citotóxico, a avaliação da produção de ROS, e a avaliação do efeito neuroprotetor contra o stress oxidativo. Relativamente ao ensaio da inibição da AChE, este realizou-se com diferentes concentrações de fração fenólica das três subespécies (50 a 800 µg/mL), sendo que a subespécie que se revelou mais potente foi o *Juniperus phoenicea* subsp. *turbinata* que apresentou uma inibição de 72,65% com uma concentração de 800 µg/mL, seguido do *Juniperus phoenicea* subsp. *phoenicea* e do *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* que apresentou uma inibição inferior a 50%. As frações fenólicas que obtiveram melhores resultados foram as que apresentaram uma maior concentração de procianidinas e menor concentração de flavonóides. No ensaio que avaliou o **perfil citotóxico** foram utilizadas **células de neuroblastoma, SK-NMC**, para avaliar a viabilidade celular. Utilizaram-se concentrações crescentes das **frações fenólicas** em estudo (0 a 500 µg/mL) e a subespécie que se revelou menos tóxica foi o *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* que necessitou de uma concentração superior a 100 µg/mL para causar morte celular. O teste que avaliou a produção intracelular de ROS utilizou as frações fenólicas em

concentrações não tóxicas para as células. Na ausência de stress oxidativo, as três subespécies diminuíram a produção de ROS nas células expostas entre 2 e 24 horas, tendo ocorrido a redução mais significativa às 24h de incubação. Na situação em que se estudou a inibição da produção de ROS com exposição a stress oxidativo não letal, ocorreu uma inibição significativa desta produção quando as células foram submetidas a um tratamento de 2 horas com as frações fenólicas em análise. Estes resultados foram comparados com os resultados obtidos de células expostas a stress oxidativo não letal, mas sem serem tratadas com as frações fenólicas. No último estudo realizado, que avaliou o efeito neuroprotetor das frações fenólicas contra o stress oxidativo, as células do neuroblastoma foram agredidas com 300 µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 24h, o que geralmente provoca uma redução de 50% na viabilidade celular. Utilizaram-se dois parâmetros para avaliar o efeito neuroprotetor, a viabilidade celular através da avaliação da integridade da membrana e a medição do potencial transmembranar da mitocôndria. Os resultados obtidos neste teste levaram a concluir que apenas as frações fenólicas da subespécie ***Juniperus oxycedrus subsp. badia*** conseguiu proteger a viabilidade celular e potenciar um aumento no potencial de membrana das mitocôndrias (38).

#### 4.3.7. Atividade hipoglicemiante

Como anteriormente referido as plantas da espécie *Juniperus oxycedrus* eram utilizadas pelos povos antigos no tratamento da diabetes *mellitus*. Para comprovar esta utilização foram realizados alguns estudos.

No estudo desenvolvido por Orhan *et al.*, (2011) foram utilizados **extratos aquosos e alcoólicos** das **bagas** da subespécie ***Juniperus oxycedrus subsp. oxycedrus*** (**Tabela 1**), para avaliar a sua atividade hipoglicemiante em ratos normoglicémicos, hiperglicémicos e diabéticos (induzidos por estreptozotocina). Este estudo demonstrou um efeito hipoglicemiante mais significativo no **extrato alcoólico** do que no extrato aquoso. Foi estudada a sua composição química e foram identificados três compostos principais, o ácido chiquímico, o ácido ferrúlico e o ácido oleorupeico, sendo que o mais abundante é o ácido chiquímico tendo o estudo prosseguido com este composto. A atividade hipoglicemiante do ácido chiquímico foi testada nos ratos em duas doses diferentes (15 e 30 mg/kg) sendo que a dose que obteve melhores resultados foi a mais elevada demonstrando ser mais efetiva que o medicamento de referência utilizado (glipizida). Após a administração, os níveis plasmáticos de insulina, colesterol total, triglicéridos, das enzimas AST, ALT e ALP foram avaliados. Os níveis de triglicéridos e das enzimas reduziram significativamente, mas não ocorreu aumento dos valores de insulina nem do colesterol total. Também foi possível concluir que na dosagem de 15 mg/kg a inibição da peroxidação lipídica é bastante pronunciada e na dosagem de 30

mg/kg ocorreu um aumento moderado dos níveis de GSH (glutaciona) nos tecidos renais e cardíacos. Ou seja, os parâmetros bioquímicos avaliados demonstraram que a administração do ácido chiquímico consegue melhorar as complicações da diabetes *mellitus* (41).

Um outro estudo desenvolvido por Orhan *et al.*, (2012), avaliou a atividade hipoglicemiante da subespécie ***Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*** (Tabela 1) dos **extratos aquoso e alcoólico**, mas desta vez das **folhas** da planta. Foram utilizados ratos normoglicêmicos, hiperglicêmicos e diabéticos (induzidos por estreptozotocina). Tal como no estudo anterior o extrato alcoólico demonstrou ser mais efetivo do que o extrato aquoso, e procedeu-se ao estudo da sua composição. Foram identificados cinco compostos maioritários, o linoleato de metil, o palmitato de metil, o linolenato de metil, o ácido palmítico e o ácido linoleico. O **extrato alcoólico** demonstrou então atividade hipoglicemiante em ratos normoglicêmicos o que pode ser devido ao efeito direto na secreção de insulina ou o efeito do extrato mimetiza a ação da insulina (40).

Ainda para a subespécie ***Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus***, Loizzo *et al.* (2007), realizaram um estudo em que avaliaram a atividade hipoglicemiante dos **óleos essenciais** das **bagas** e da **madeira** desta planta, através da inibição da enzima  $\alpha$ -amilase. Esta enzima é a principal enzima humana responsável pela clivagem do amido em açúcares simples. Apesar da atividade desta enzima não estar diretamente envolvida na etiologia da diabetes, os inibidores da  $\alpha$ -amilase têm vindo a ser interpretados como responsáveis pelo aumento da tolerância à glucose nos doentes diabéticos. No estudo, foram identificados os compostos maioritários dos óleos essenciais, tendo o óleo essencial das bagas uma fração maioritária de monoterpenos (68,4%) –  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -mirceno são os compostos principais – e a fração principal do óleo essencial da madeira é composta por sesquiterpenos – maioritariamente constituída por  $\delta$ -cadineno e *cis*-tujopseno. Os resultados obtidos revelaram uma atividade promissora para o óleo essencial da madeira (IC<sub>50</sub> de 3,49  $\mu$ L/mL) enquanto que para o óleo essencial das bagas, os resultados demonstraram apenas um atividade moderada (IC<sub>50</sub> de 25  $\mu$ L/mL) (47).

#### 4.3.8. Atividade antitumoral

O cancro é nos dias de hoje uma das principais causas de morte em todo o mundo sendo, por isso, o estudo e a descoberta de moléculas com atividade antitumoral cada vez mais importante. Muitas vezes, o cancro surge como consequência de uma disrupção na homeostasia entre a sobrevivência celular e os processos de morte celular programada (apoptose), e por isso, é útil avaliar o mecanismo antitumoral adjacente às novas moléculas descobertas. A apoptose pode ocorrer por duas vias, a intrínseca e a

extrínseca. A via intrínseca, ou apoptose induzida pela via mitocondrial, é iniciada dentro das células que leva a uma alteração da permeabilidade mitocondrial e à libertação de mediadores pro-apoptóticos, como o citocromo c. O citocromo c forma um complexo aptossómico com outros componentes que desencadeia a cascata das caspases, o que leva à fragmentação do DNA. A via extrínseca é induzida pela ligação de ligandos aos recetores de morte celular, tais como, os recetores do fator de necrose tumoral, e estes ligandos desencadeiam a cascata das caspases.

Neste estudo foram, inicialmente, avaliados vários géneros de plantas, sendo que, o teste que avaliou a viabilidade celular após exposição a 10 µg/mL dos extratos em estudo selecionou a espécie ***Juniperus communis*** (Tabela 1), como sendo a mais promissora porque foi o único extrato (**extrato metanólico dos ramos e folhas**) que provocou um drástico decréscimo no crescimento das células MDA-MB-231, do cancro da mama, em comparação com as células tratadas com os outros extratos. Para determinar se este decréscimo de crescimento se deu por via apoptótica foi realizado um ensaio fluorométrico para determinar a atividade das caspases. As células que foram tratadas com o extrato de *Juniperus communis* demonstraram um sinal apoptótico forte nas primeiras 24h de tratamento comparando com as outras amostras e controlos. Os níveis apoptóticos (caspases 3 e 7) foram também medidos nas células não cancerígenas do tecido mamário, MCF10A, onde se verificou apenas um ligeiro aumento depois do tratamento com o extrato de *Juniperus communis*, relativamente aos valores basais, não apresentando por isso efeitos nefastos para as células saudáveis. Assim, o **extrato metanólico** de ***Juniperus communis*** demonstrou ser um potente **indutor da apoptose** e provou ser **específico** para as **células malignas do cancro da mama**. A composição do extrato foi estudada por cromatografia e foram isolados e caracterizados dois compostos maioritários com capacidade de induzir a apoptose nas células MDA-MB-231, o **ácido isocupressico** e a **deoxipodofilotoxina (DPT)**. Os dois compostos são fortes indutores da atividade das **caspases 3 e 7** nas células em estudo, porém a DPT demonstrou ser mais potente. Foi avaliada a alteração de potencial de membrana mitocondrial para determinar a via apoptótica utilizada por este composto e a respetiva ausência de alteração leva a acreditar que se trata da **via extrínseca** (51). Para a subespécie ***Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus*** (Tabela 1) foram também realizados estudos para avaliar a sua atividade antitumoral. Utilizou-se o **extrato alcoólico** das **bagas** e três linhas celulares cancerígenas, sendo estas, a linhagem A375 (melanoma), a linhagem MCF-7 (mama) e a linhagem H460 (pulmão). Começou por se estudar a viabilidade celular das três linhagens cancerígenas após exposição ao extrato em estudo durante 24 horas. Apenas ocorreu decréscimo significativo na viabilidade celular das células do cancro de mama (MCF-7), atingindo 50% da inibição

do crescimento a uma dosagem de 200 µg. Posteriormente, foram isolados cinco compostos do extrato, um novo monoterpene glicosídico, o ácido chiquimico, um monoterpene glicosídico já conhecido, o *n*-butil-*D*-frutopiranosido e o ramnósido fenilpropanoide. Estes compostos, no estado puro, foram testados nas células MCF-7, no entanto apenas o ácido chiquimico demonstrou um decréscimo significativo na viabilidade celular atingindo 50% da inibição do crescimento a uma dosagem de 30 µM. Foi testada a capacidade do ácido chiquimico induzir apoptose nas células MCF-7, no entanto não ocorreu um aumento significativo deste mecanismo. Avaliou-se ainda a intensidade de fluorescência das citocinas após o tratamento com todos os compostos isolados, no entanto não ocorreu qualquer alteração significativa; porém os níveis do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e de citocinas pro-inflamatórias diminuíram de um modo dose-dependente (para o ácido chiquimico), estes resultados são interessantes, porque estas citocinas promovem a angiogênese tumoral (43).

A **Tabela 1** resume as bioatividades demonstradas para as diferentes subespécies de *Juniperus* em estudo.

Tabela 1 - Quadro resumo das bioatividades de cada espécie do género *Juniperus*.

Bioatividade	Espécie/Subespécie	Órgão	Extrato/óleo essencial	Compostos Bioativos	Alvo	Efeito
<b>Atividade antioxidante</b>	<i>Juniperus communis</i>	Bagas	Óleo essencial	Hidrocarbonetos monoterpénicos (compostos fenólicos)	NA <sup>1</sup>	Atividade antioxidante por diferentes mecanismos
	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	Bagas	Extrato metanólico	Flavonóides (amentoflavona; cupressoflavona)	NA <sup>1</sup>	Atividade antioxidante inferior ao C+
	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>macrocarpa</i>	Bagas	Extrato metanólico	Flavonóides (cupressoflavona); Ácidos fenólicos	NA <sup>1</sup>	Atividade antioxidante inferior ao C+
	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	Bagas	Óleo essencial	Monoterpenos	NA <sup>1</sup>	Atividade antioxidante inferior relativamente ao óleo essencial da madeira
	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	Madeira	Óleo essencial	Sesquiterpenos	NA <sup>1</sup>	Atividade antioxidante superior relativamente ao óleo essencial das bagas
	<i>Juniperus oxycedrus</i>	Folhas	Extrato aquoso	Compostos Fenólicos	NA <sup>1</sup>	Atividade antioxidante inferior ao C+
	<i>Juniperus phoenicea</i>	Folhas	Extrato aquoso	Compostos Fenólicos	NA <sup>1</sup>	Atividade antioxidante inferior ao C+
	<i>Juniperus thurifera</i>	Folhas	Extrato aquoso	Compostos Fenólicos	NA <sup>1</sup>	Atividade antioxidante inferior ao C+
	<i>Juniperus phoenicea</i>	Folhas	Óleo essencial	Monoterpenos	NA <sup>1</sup>	Baixa Atividade antioxidante
	<i>Juniperus phoenicea</i>	Bagas	Óleo essencial	Monoterpenos	NA <sup>1</sup>	Baixa Atividade antioxidante
	<i>Juniperus phoenicea</i>	Folhas	Extrato acetato de etilo; diclorometano, etanólico e metanólico	Polifenóis; Taninos; Flavonóides; Antocianinas	NA <sup>1</sup>	Atividade antioxidante superior relativamente aos extratos das bagas
	<i>Juniperus phoenicea</i>	Bagas	Extrato acetato de etilo; diclorometano, etanólico e metanólico	Polifenóis; Taninos; Flavonóides; Antocianinas	NA <sup>1</sup>	Atividade antioxidante inferior relativamente aos extratos das folhas
	<i>Juniperus oxycedrus</i>	ND	Extrato metanólico	ND	Bactérias, leveduras e fungos	Inibição do crescimento de leveduras e bactérias

<b>Atividade antimicrobiana</b>	<i>Juniperus phoenicea</i>	Folhas	Óleo essencial	Monoterpenos	bactérias Gram + bactérias Gram - fungos	Atividade antimicrobiana razoável para todos os microrganismos
	<i>Juniperus phoenicea</i>	Bagas	Óleo essencial	Monoterpenos	bactérias Gram + bactérias Gram - fungos	Atividade antimicrobiana razoável para todos os microrganismos
	<i>Juniperus phoenicea</i>	Folhas	Extrato acetato de etilo; diclorometano, etanólico e metanólico	Polifenóis; Taninos; Flavonóides; Antocianinas	bactérias Gram + bactérias Gram - fungos	Atividade antimicrobiana para <i>B. subtilis</i> (Gram +); <i>P. aeruginosa</i> (Gram -); e <i>M. Ramannianus</i> (fungo)
	<i>Juniperus phoenicea</i>	Bagas	Extrato acetato de etilo; diclorometano, etanólico e metanólico	Polifenóis; Taninos; Flavonóides; Antocianinas	bactérias Gram + bactérias Gram - fungos	Atividade antimicrobiana para <i>B. subtilis</i> (Gram +); <i>P. aeruginosa</i> (Gram -); e <i>M. Ramannianus</i> (fungo)
	<i>Juniperus thurifera</i>	Madeira	Óleo essencial	Sesquiterpenos	Bactérias Gram +, Gram - e leveduras	Atividade antimicrobiana para as bactérias
<b>Atividade anti- inflamatória</b>	<i>Juniperus communis</i> subsp. <i>saxatilis</i>	Caules, bagas e folhas	Extrato aquoso e metanólico	ND	Modelo animal com edema da pata	Remissão notável do edema da pata
	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	Caules, bagas e folhas	Extrato aquoso e metanólico	ND	Modelo animal com edema da pata	Remissão notável do edema da pata
<b>Atividade herbicida</b>	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>macrocarpa</i>	Folhas	Óleo essencial	Monoterpenos; Sesquiterpenos	Ervas daninhas ( <i>Phalaris paradoxa</i> , <i>Trifolium campestre</i> e <i>Lolium rigidum</i> )	Inibição do crescimento
<b>Atividade gastroprotetora</b>	<i>Juniperus phoenicea</i>	Folhas	Óleo essencial	Monoterpenos; hidrocarboneto	Modelo animal com úlcera gástrica	Diminuição da ocorrência de lesões gástricas; Redução da acidez gástrica; Aumento da produção de muco; Manutenção da integridade da mucosa
<b>Atividade neuroprotetora</b>	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i>	Folhas	Extrato hidroetanólico	Catequinas, procianidinas, derivados de flavonóides	Células do neuroblastoma SK-NMC	Inibição da produção de ROS; Proteção da viabilidade celular

	<i>Juniperus phoenicea</i> subsp. <i>phoenicea</i>	Folhas	Extrato hidroetanólico	Catequinas, procianidinas, derivados de flavonóides	Células do neuroblastoma SK-NMC	Inibição da produção de ROS
	<i>Juniperus phoenicea</i> subsp. <i>turbinata</i>	Folhas	Extrato hidroetanólico	Catequinas, procianidinas, derivados de flavonóides	Células do neuroblastoma SK-NMC	Inibição da produção de ROS
<b>Atividade hipoglicemiante</b>	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	Bagas	Extrato aquoso	ND	Modelo animal	Efeito Hipoglicemiante
	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	Bagas	Extrato alcoólico	Ácido chiquímico	Modelo animal <sup>2</sup>	Efeito Hipoglicemiante
	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	Folhas	Extrato aquoso	ND	Modelo animal <sup>2</sup>	Efeito Hipoglicemiante
	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	Folhas	Extrato alcoólico	Linoleato de metil, palmitato de metil, linolenato de metil, ácido palmítico e ácido linoleico	Modelo animal <sup>2</sup>	Efeito Hipoglicemiante (R. NGL.)
	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	Bagas	Óleo essencial	Monoterpenos ( $\alpha$ -pineno e $\beta$ -mirceno)	Modelo animal	Efeito Hipoglicemiante
	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	Madeira	Óleo essencial	Sesquiterpenos ( $\delta$ -cadineno e cis-tujopseno)	Modelo animal	Efeito Hipoglicemiante
<b>Atividade antitumoral</b>	<i>Juniperus communis</i>	Ramos e Folhas	Extrato metanólico	Ácido isocupressico e deoxipodofilotoxina	Células do cancro da mama MDA-MB-231	Indução da apoptose (aumento das caspases 3 e 7)
	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>oxycedrus</i>	Bagas	Extrato alcoólico	Ácido chiquímico, n-butil-D-frutopiranosido, ramnósido fenilpropanoide	Melanoma (A375); Cancro da mama (MCF-7); Cancro do pulmão (H460)	Inibição da viabilidade celular das células do cancro da mama MCF-7; Inibição da angiogénese
	<i>Juniperus oxycedrus</i> subsp. <i>badia</i>	Folhas	Extrato proteico total	Lectinas	Células do cancro do cólon HT-29	Ligação aos recetores glicosilados das células do cancro do cólon (HT-29); Inibição da invasão celular das células do cancro do cólon (HT-29); Inibição da atividade das MMP-9

NA – Não aplicável;

ND – Não descrito;

<sup>1</sup> – Atividade antioxidante avaliada por metodologia de DPPH, ABTS, Medição da capacidade quelante do ião hidroxilo (OH<sup>-</sup>), Capacidade sequestrante de eletrões do radical superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) e Efeito inibitório da xantina oxidase;

<sup>2</sup> – Ratos normoglicémicos (R. NGL.); Ratos hipoglicémicos (R. HGL.); Ratos diabéticos (R. Diab.);

C+ - Controlo Positivo .

#### **4.4. Avaliação do potencial antitumoral da subespécie *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia***

À data foram já publicados alguns trabalhos que descrevem a atividade antitumoral exercida pelo *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, endereçando esta bioatividade, principalmente, aos fenóis (**Tabela 1**). As lectinas não têm sido contextualizadas dentro desta atividade. Em trabalhos anteriores (52,53), determinou-se a atividade de lectina nos extratos proteicos totais de folha de *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, com afinidade para as células HT-29, do cancro do cólon, decidiu-se clarificar e aprofundar o papel das lectinas desta subespécie no processo tumoral.

##### **4.4.1. Lectinas v.s. bioatividade**

Subentende-se por lectinas, qualquer proteína que possua pelo menos um domínio e que se ligue reversivelmente, e de modo específico, a hidratos de carbono, de origem não imunológica e que não exibe atividade catalítica (54). As lectinas são um grupo de proteínas bioativas que se encontram em quase todos os organismos incluindo plantas, vertebrados, invertebrados, bactérias e vírus (55). As fontes mais ricas de lectinas são, genericamente, os órgãos de reserva das plantas, como as sementes (órgão mais estudado até ao momento). No entanto, não são apenas as sementes, mas também as raízes (*Urtica*, *Phytolacca*, *Sambucus*, *Trichosanthes*, *Calystegia*), tubérculos ou bolbos (*Solanum*, *Galanthus*, *Scilla*, *Allium*, *Crocus*, *Tulipa*, *Iris*), a casca (*Sambucus*, *Sophora*, *Robinia*, *Maackia*, *Laburnum*, *Cytisus*, *Cladrastis*, *Hevea*, *Abies*) ou até as folhas (*Arbustos unedo*, *Aloe*, *Lactuca*, *Vicia unijuga*, *Viscum album*) também podem conter uma quantidade considerável de lectinas (56,57).

Do ponto de vista molecular, as lectinas encontram-se maioritariamente em órgãos de reserva, mas também no citoplasma das células e, ainda no espaço intercelular. A quantidade de lectinas pode variar muito de uma espécie de planta para outra. (56).

Na **Tabela 2**, é possível avaliar a quantidade de lectinas purificadas existentes em sementes de várias espécies de plantas. É ainda possível verificar que, dentro da mesma espécie, esta quantidade pode variar consideravelmente.

**Tabela 2** - Quantidade de lectinas presentes em algumas espécies de plantas

<b>Espécies de plantas</b>	<b>Família</b>	<b>mg de lectinas / 100 g de semente</b>
<i>Canavalia ensiformes</i>	<i>Leguminosae</i>	2100
<i>Ricinus communis</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	1400
<i>Vicia cracca I</i>	<i>Leguminosae</i>	1400
<i>Phaseolus vulgaris</i>	<i>Leguminosae</i>	1200
<i>Griffonia simplicifolia I</i>	<i>Leguminosae</i>	700
<i>Griffonia simplicifolia II</i>	<i>Leguminosae</i>	300
<i>Glycine max</i>	<i>Leguminosae</i>	300
<i>Robinia pseudoacacia</i>	<i>Leguminosae</i>	300
<i>Arachis hypogaea</i>	<i>Leguminosae</i>	190
<i>Sophora japónica</i>	<i>Leguminosae</i>	170
<i>Phaseolus lunatus</i>	<i>Leguminosae</i>	170
<i>Wisteria floribunda/sinensis</i>	<i>Leguminosae</i>	160
<i>Vicia cracca II</i>	<i>Leguminosae</i>	150

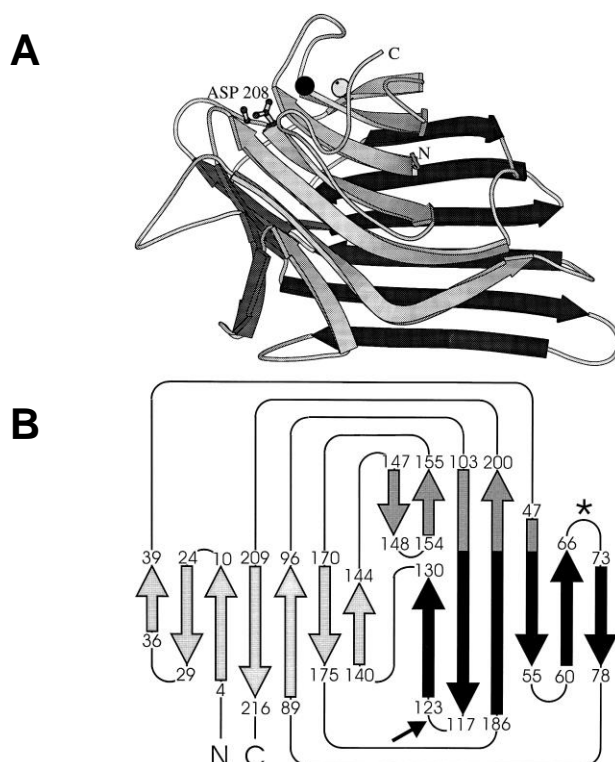
(Adaptado de Rüdiger e Gabius, 2001 (56))

#### **4.4.1.1. Estrutura**

A estrutura de lectinas mais comumente observada é a estrutura das lectinas de leguminosas, observada e descrita pela primeira vez na Concanavalina A (Con-A) (58). Algumas lectinas são compostas por subunidades com diferentes locais de ligação. Estes locais interagem com os seus ligandos, maioritariamente, por pontes de hidrogénio, com a contribuição de forças de Van der Waals e interações hidrofóbicas. A estabilidade de uma lectina depende da sua estrutura terciária ou quaternária e de outras características adicionais únicas (55).

Os monómeros das lectinas de leguminosas possuem uma estrutura bem conservada. Consiste em 3 folhas pregueadas- $\beta$ , uma posterior (constituída por 6 fitas), uma anterior (constituída por 7 fitas) e uma folha mais pequena (constituída por 5 fitas) – folha S – que tem como função manter as duas folhas maiores juntas. A região hidrofóbica principal está localizada entre a folha posterior e a anterior. Nesta estrutura não existem hélices- $\alpha$  e cerca de 50% dos resíduos estão na região do “loop”. Um dos “loops” enrola-

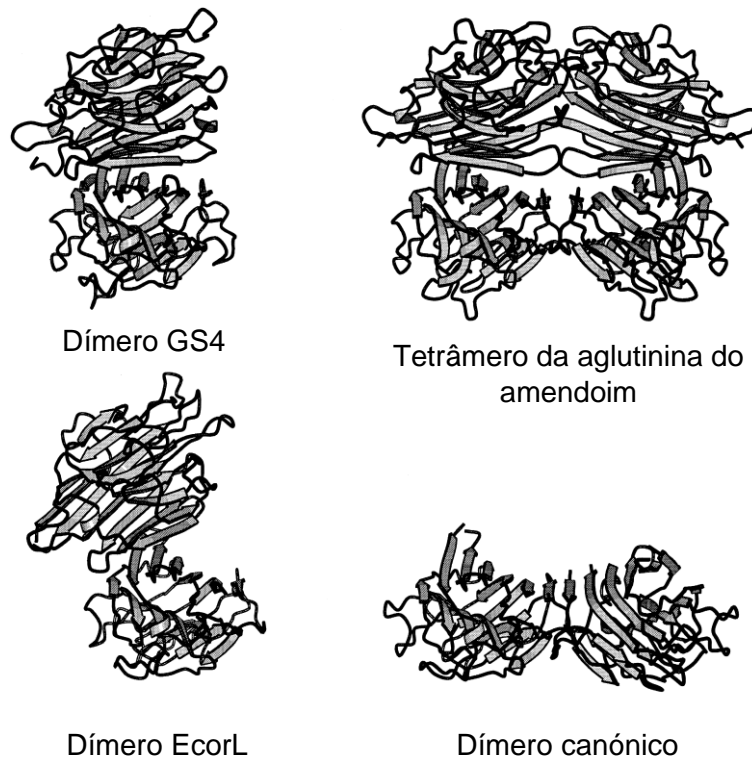
se na folha anterior, o que resulta na segunda região hidrofóbica (entre a folha anterior e o “loop”) (**Figura 9**) (59).



**Figura 9 - Monómero de lectina de leguminosa. A** – Diagrama de fitas do monómero de Concanavalina A. O resíduo *cis*-aspartato, Asp 208, está representado por bola e bastonete enquanto o manganês e o cálcio estão representados por esferas cinza e preta, respetivamente. A folha posterior, constituída por 6 fitas, está marcada de cinza, e a folha pequena – folha S – está marcada a cinza escuro. **B** – Diagrama topológico do enovelamento do monómero da lectina de leguminosa. O código de identificação das folhas é idêntico aos descrito em **A**. Os terminais C- e N- são os encontrados para a Concanavalina A. A posição destes terminais nas estruturas de permuta circular, da maioria das lectinas, está indicado por um asterisco. (adaptado de Loris *et al.*, 1998 (59))

Grande parte das lectinas de leguminosas conhecidas possuem uma estrutura chamada de “dímero canónico”. Este dímero é caracterizado por 12 fitas largas de folhas pregueadas- $\beta$ , que resulta da associação de duas folhas posteriores de 6 fitas pregueadas- $\beta$  (59).

Existem outras estruturas para além do dímero canónico das quais são representativas as lectinas da árvore de coral (*Erythrina corallodendron*) e a lectina IV da *Griffonia simplicifolia*. Na **Figura 10**, é possível comparar estas estruturas com o dímero canónico.



**Figura 10 - Dímeros de lectinas de leguminosas e o tetrâmero da aglutinina de amendoim.**  
(adaptado de Loris *et al.*, 1998 (59))

#### 4.4.1.2. Centro de ligação ao hidrato de carbono

As características bioativas das lectinas, nomeadamente, a sua ligação aos hidratos de carbono, está dependente, simultaneamente da presença de iões cálcio e de outro metal de transição. Estas estruturas estão bem conservadas em outras lectinas de leguminosas e a sua estabilidade é reversível pela remoção desses metais, o que resulta em importantes mudanças conformacionais.

As interações essenciais através das quais as lectinas reconhecem os hidratos de carbono são as ligações de hidrogénio, coordenação com metais e interações hidrofóbicas de Van der Waals. O grande número de grupos hidroxilo existentes nos açúcares serve tanto como doador quanto recetor na formação de ligações de hidrogénio. Da parte das lectinas, a cadeia lateral de átomos de Asp e Asn, o hidrogénio do amido e o oxigénio do carboxilo da cadeia principal também participam na formação destas ligações. Nas lectinas de leguminosas, catiões divalentes como o  $\text{Ca}^{2+}$  e o  $\text{Mg}^{2+}$  estão envolvidos no reconhecimento indireto dos hidratos de carbono, uma vez que modulam o centro de ligação das lectinas. Apesar do carácter hidrofóbico geral dos hidratos de carbono as interações hidrofóbicas representam um papel essencial no reconhecimento pelas lectinas. Isto é particularmente notado na interação entre os resíduos aromáticos e a galactose em lectinas galactose específicas. Nas interações

não polares a zona alifática do açúcar está disposta contra uma ou mais cadeiras laterais aromáticas da proteína, proporcionando uma superfície geométrica apolar complementar (60).

#### 4.4.1.3. Classificação

As lectinas podem ser classificadas de três modos diferentes, com base nos centros de ligação ao hidrato de carbono, com base na especificidade de ligação aos hidratos de carbono e de acordo com a sua evolução genética, em famílias.

Relativamente à classificação com base na sua estrutura (centros de ligação ao hidrato de carbono) as lectinas podem ser classificadas em:

- a) **Merolectinas** – proteínas que possuem apenas um centro de ligação aos hidratos de carbono. Por definição são monovalentes e, conseqüentemente, não conseguem precipitar glicoconjugados ou aglutinar células (61). Como exemplo característico deste grupo temos a heveína, uma proteína da árvore de borracha (*Hevea brasiliensis*) (62).
- b) **Hololectinas** – são constituídas por pelo menos dois centros de ligação aos hidratos de carbono, idênticos ou similares. Por definição são di- ou multivalentes e, conseqüentemente, aglutinam células e/ou precipitam glicoconjugados. A maioria das lectinas de plantas pertencem a esta classe (61).
- c) **Quimerolectinas** – são proteínas que possuem um ou mais centros de ligação aos hidratos de carbono e outro centro com atividade catalítica (ou outra atividade biológica) que funciona independentemente do centro de ligação aos hidratos de carbono. Dependendo do número de locais de ligação aos hidratos de carbono, as quimerolectinas comportam-se como merolectinas ou hololectinas (61).
- d) **Superlectinas** – tal como as hololectinas, as superlectinas contêm pelo menos dois centros de ligação aos hidratos de carbono. Contudo, ao contrário das hololectinas, o seu centro de ligação aos hidratos de carbono reconhece também açúcares estruturalmente não relacionados (54).

Com base na especificidade de ligação aos hidratos de carbono as lectinas podem ser agrupadas nos seguintes grupos: (63)

- Grupo I - Lectinas glucose/manose
- Grupo II - Lectinas *N*-acetilgalactosamina/ galactose
- Grupo III – Lectinas *N*-acetilglucosamina
- Grupo IV - Lectinas *L*-fucose

- Grupo V - Lectinas ácido siálico
- Lectinas específicas de oligossacáridos e polissacáridos complexos.

O rápido progresso das análises proteômicas e a clonagem molecular têm revelado a sequência detalhada de lectinas vegetais. A análise destas sequências permitiu a distinção de doze famílias de acordo com suas especificidades a hidratos de carbono (64) (Tabela 3).

**Tabela 3** – Classificação das lectinas de plantas baseada na evolução genética de famílias

Família	Lectina representativa	Abreviat.	Especificidade
Domínio aglutinina <i>Agaricus bisporus</i>	<i>Agaricus bisporus</i> aglutinina	ABA	Galactose
Amarantinas	<i>Amaranthus caudatus</i> aglutinina	ACA	N-acetil-D-Glucosamina
Classe V ligantes de quitina	Aglutininas relacionadas com quitina	CRA	N-glicanos do tipo elevada-manose
Domínio Cianovirina	Cianovirina-N	CV-N	Manose
Domínio Aglutinina <i>Euonymus europaeus</i> (EEA)	Aglutinina <i>Euonymus europaeus</i>	EEA	Manose / Galactose
Domínio Aglutinina <i>Galanthus nivalis</i> (GNA)	Lectina <i>Polygonatum cyrtonema</i>	PCL	Manose / Ácido siálico
Domínio de heveina	<i>Wheat germ</i> aglutinina	WGA	N-acetil-D-Glucosamina
Domínio Jacalina	Jacalina	JAC	Manose
Lectinas Leguminosas	Concanavalina A	Con A	Manose
Domínio Lisina			
Domínio Aglutinina <i>Nicotiana Tabacum</i>	<i>Cucurbitaceae phloem</i>	CPL	
Domínio Ricina-B	<i>European mistletoe</i>	ML-1	β-galactose

(Adaptado de Van Damme, 2008 (64))

#### 4.4.1.4. Funções biológicas das lectinas

Como já foi referido anteriormente as lectinas são moléculas transversais a todos os reinos, sendo, portanto, passíveis de se encontrar em diversos organismos, desde plantas, microrganismos e animais, desempenhando numerosos processos a nível celular (65). Grande parte das lectinas estão provavelmente envolvidas na defesa da planta contra microrganismos fitopatogénicos e insetos, assim como, contra animais

predadores (61). As lectinas têm diversas funções, desde **atividade antiviral, antibacteriana, antifúngica**. As lectinas WGA (wheat germ agglutinin), PNA (peanut lection) e SBA (soybean agglutinin) inibem a esporulação e crescimento de fungos como *Trichoderma viride*, *Penicillium notatum* e *Aspergillus niger* (66); **inseticida** (WGA e jacalina) até **toxicidade para os animais superiores**. Apesar da interferência direta com vírus e microrganismos ser excecional, os efeitos nos predadores invertebrados e nos animais superiores é óbvia (61). Existem estudos que defendem que as lectinas estão envolvidas com determinadas bactérias num **processo simbiótico** de fixação do azoto. É exemplo a bactéria *Rhizobium leguminosarum* (67,68).

Durante muitos anos, as lectinas eram consideradas substâncias tóxicas para as células e para os animais, principalmente devido à aglutinação dos eritrócitos e de outras células. No entanto, tem vindo a ser revelado que diversas lectinas de plantas são ferramentas importantes na biologia celular e imunologia, com enorme potencial para variadas aplicações clínicas quer no diagnóstico quer na terapêutica (55).

Hoje em dia, é claro que as lectinas exibem **atividade antitumoral** e estão envolvidas em inúmeros processos fisiológicos (69) e que estas são capazes de inibir a sínteses de ADN, ARN e proteínas tumorais, mas não das células normais, assim como, conseguem induzir processos de apoptose, necrose e autofagia celular, processos estes que têm vindo a ser estudados como possíveis terapias para o tratamento do cancro (55,70).

As lectinas têm vindo a ser estudadas não só para aplicações terapêuticas, mas também para o diagnóstico de cancro, uma vez que, são biomarcadores versáteis utilizados em estudos histoquímicos, bioquímicos e funcionais das células tumorais. Devido à sua complexidade e variabilidade estrutural, os hidratos de carbono à superfície das células funcionam como sinais de reconhecimento (55,71).

#### **4.4.1.5. Mecanismo de ação antitumoral das lectinas**

As lectinas apresentam diversos mecanismos de ação, sendo os mais importantes aqueles que envolvem a **libertação de mediadores**, após a ligação a um recetor celular – **via extrínseca** – e aqueles que envolvem, a **entrada na célula** e consequentes alterações nas funções celulares – **via intrínseca**.

A **via extrínseca** de indução da apoptose é iniciada pela interação entre o ligando e recetores membranares específicos, denominados recetores de morte celular: TNF (*tumor necrosis factor*); Fas e TRAIL (**Figura 11**). Cada um deste recetores contem um domínio intracelular de interação com proteínas globulares, chamado domínio da morte celular (DD – *death domain*). *Death Efactor Domain*). A proteína FADD liga-se ao recetor através de um DD e à pró-caspase 8 através de um DED, formando um complexo DISC

(*Death Inducing Signaling Complex*). O recrutamento da caspase 8, por sua vez, ativa a caspase 3, caspase efetora que inicia o processo apoptótico (**Figura 11**) (72,73).

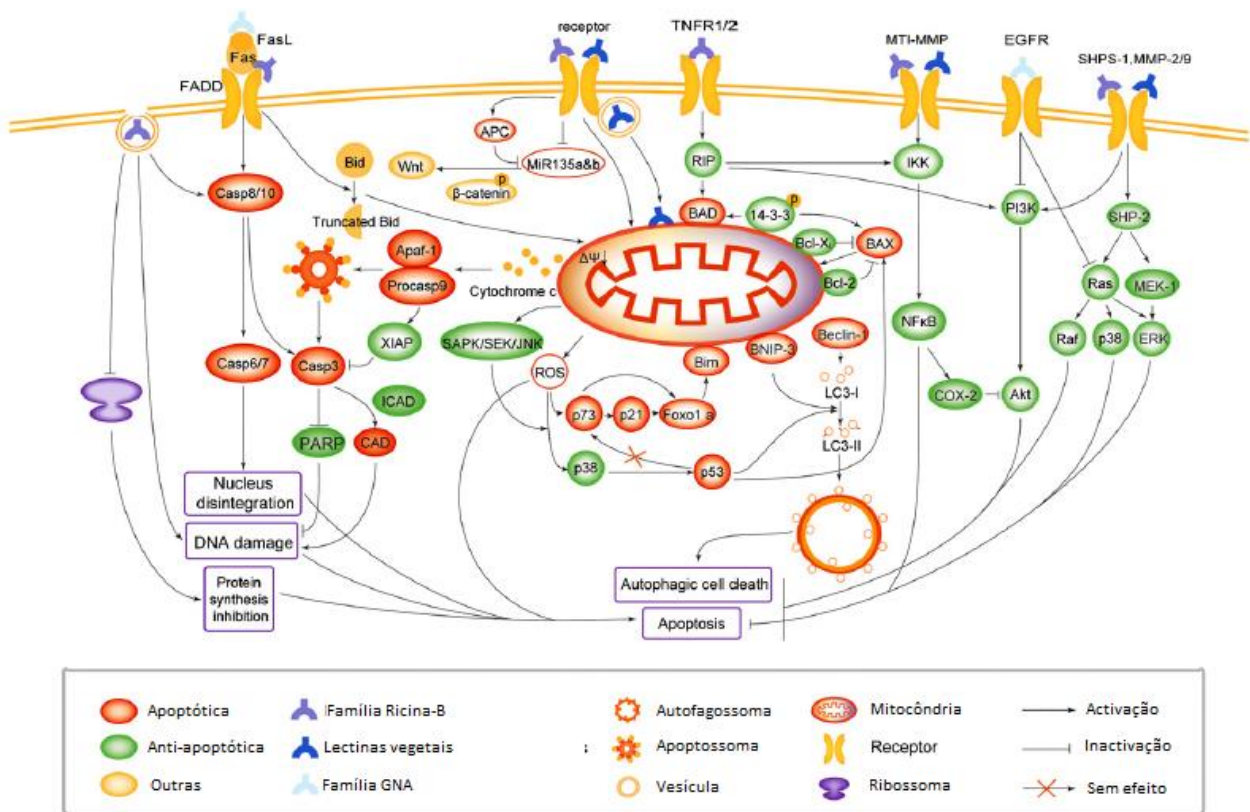
Relativamente à **via intrínseca**, também denominada **mitocondrial**. Sabe-se que a mitocôndria possui um sistema de transporte latente conhecido por “permeabilidade transicional mitocondrial”, cuja ativação ocorre em certas condições e traduz-se na permeabilização da membrana mitocondrial a iões, incluindo o cálcio. Pensa-se que esta permeabilidade mitocondrial possa ser uma das vias de condução de moléculas pró-apoptóticas.

Assim, os poros de permeabilidade transicional existentes na membrana mitocondrial abrem-se quando há um excesso de iões cálcio e fosfato, o que despolariza a mitocôndria e desacopla a cadeia respiratória. O poro de permeabilidade transicional mitocondrial (PTPm), favorece a cascata de caspases e favorece a morte celular ao libertar fatores indutores da apoptose como o citocromo c, fatores de fragmentação do núcleo e proteínas como SMAC/DIABLO, que neutralizam os inibidores endógenos da apoptose (AIF – *Apoptosis Inducing Factor*) (**Figura 11**).

A proteína de translocação mitocondrial (TSPO) interage com VDAC para desempenhar um papel na apoptose, produzindo espécies reativas de oxigénio (ROS). A geração de ROS induz a ativação da via mitocondrial da apoptose, uma vez que, são as ROS que são capazes de libertar o citocromo c. Estudos revelam que a caspase 2 está envolvida na libertação do citocromo c pelas mitocôndrias das células apoptóticas. A caspase 2 é ativada temporariamente em resposta ao stress genotóxico e pode funcionar como modeladora da via apoptótica mitocondrial. A ativação da caspase 2 ocorre dentro de um complexo multiproteico, constituído por proteínas induzidas pelo gene supressor tumoral p53, PIDD (*p53-induced protein with death domain*), proteínas adaptadoras da morte RAIDD e outras proteínas (**Figura 11**).

A permeabilização da membrana externa e consequente libertação do citocromo c é um passo chave na indução da apoptose. Uma vez que, no citoplasma, o citocromo c, em conjunto com a molécula adaptadora Apaf-1, participa na formação do apoptossoma, resultando no recrutamento da pró-caspase 9 e ativação da caspase 9, em presença de ATP. A caspase 9 cliva e ativa as pró-caspases 3 e 7 (caspases efetoras), responsáveis pela clivagem de varias proteínas que conduzem às características bioquímicas e morfológicas da apoptose (72,74).

As famílias de lectinas, como as lectinas de leguminosas, as proteínas de inativação de ribossomas tipo II (RIPsII) e as lectinas relacionadas com GNA, têm sido estudadas devido ao seu papel em atividades biológicas (72).



**Figura 11** – As lectinas de plantas induzem a morte celular das células tumorais via morte celular programada. (adaptado de Fu *et al.*, 2011 (72))

#### 4.4.2. Avaliação da atividade de lectina em folhas da subespécie *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*

Ao longo da unidade extracurricular de projeto III, realizada no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Recursos Naturais, Ambiente e Território do Instituto Superior de Agronomia de Lisboa, caracterizei o perfil lectinómico de extratos de folhas da subespécie *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*.

O trabalho desenvolvido permitiu caracterizar o perfil polipeptídico desta espécie e, conseqüentemente, determinar a presença de lectinas, nos referidos extratos, por medição da atividade hemaglutinante, ferramenta essencial para a avaliação da especificidade das lectinas envolventes aos hidratos de carbono. A avaliação da especificidade de ligação aos hidratos de carbono, revelou um conjunto de açúcares extremamente importantes na caracterização da aberração glicómica (*D*-glucosamina, *D*-galactosamina e *D*-manose) característica do processo tumoral, sendo a manose um açúcar que faz parte do cálice das ramificações do glicoma celular.

Em trabalhos anteriores (52), já tinha sido evidenciada a ligação e discriminação de polipéptidos/lectinas, pertencentes a este extrato, com especificidade para os recetores glicosilados das células tumorais HT-29, concluindo-se que os dados se relacionavam.

O emprego de colunas de afinidade, com matriz constituída por um dos hidratos de carbono seleccionados, a manose, permitiu purificar uma lectina, cuja massa molecular foi concordante, com um dos polipéptidos que se ligaram aos recetores glicosilados das membranas das células HT-29 do cancro do colon (53). Também a incubação dos respetivos extratos proteicos com a mesma linha celular (52) tinha já revelado a inibição da invasão celular e, ainda a inibição da atividade das metaloproteinases MMP-9, constituindo um biomarcador do cancro do cólon e da metastização, revelador de um mau prognóstico.

A **Tabela 1**, contempla estes resultados, ainda não publicados.

## 5. Conclusão

Os conhecimentos sobre as plantas e as suas bioatividades foram evoluindo e hoje em dia são utilizados não só no tratamento, mas também na prevenção de doenças e na prática de um estilo de vida mais saudável.

Ao longo desta dissertação foram apresentadas algumas características das espécies e subespécies mediterrânicas do género *Juniperus*, algumas delas endémicas de várias regiões de Portugal.

Os benefícios das várias plantas deste género há muito que são conhecidos e o seu uso está relatado para o tratamento das mais variadas patologias, desde constipações, patologias a nível gástrico, ginecológico e até dermatológico.

As diferentes subespécies de *Juniperus* apresentam várias bioatividades relacionadas principalmente com compostos fenólicos, nomeadamente, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana, atividade anti-inflamatória, atividade herbicida, atividade gastro protetora, atividade neuroprotetora, atividade hipoglicemiante e atividade antitumoral, como detalhado anteriormente.

A subespécie que demonstrou ser mais promissora foi o *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia* e por isso alguns trabalhos têm sido desenvolvidos no Laboratório de Fisiologia Vegetal do Departamento de Recursos Naturais, Ambiente e Território do Instituto Superior de Agronomia de Lisboa.

O estudo intenso da bioatividade dos compostos fenólicos em extratos etanólicos e metanólicos de diferentes órgãos desta subespécie (bagas, folhas, ramos), levam à omissão de outros princípios ativos, as lectinas, já descritas para outras espécies. Esta revisão quis acrescentar e atualizar, para as subespécies em estudo, a presença destes compostos em extratos proteicos e a revelação da sua atividade antitumoral, mediante resultados obtidos e ainda não publicados, por trabalhos de disciplina de Projeto III e Mestrado em Controlo, Qualidade e Toxicologia do Alimento (MCQTA).

Estes trabalhos têm como objetivo caracterizar a atividade antitumoral, desta subespécie, para as células tumorais do cancro do cólon, HT-29, tendo já sido identificada a presença de uma ou mais proteínas com atividade lectina no extrato proteico das folhas desta subespécie que se pensa serem as mesmas que demonstraram ser importantes na ligação aos recetores glicosilados das membranas das células tumorais, do cancro do cólon, HT-29. A afinidade de ligação aos recetores glicosilados das membranas das células HT-29, por lectinas purificadas de *Juniperus oxycedrus* subsp. *badia*, e a revelação de atividade antitumoral (inibição da invasão celular e inibição da atividade das MMP-9), revelaram que estes constituintes, poderão ser uma alternativa à terapêutica antitumoral e deteção precoce de biomarcadores

tumorais, pela particularidade do seu mecanismo de ação e, pelo facto de que a maioria destes biomarcadores são glicoproteínas.

Pelas conclusões obtidas torna-se imperativo direccionar-se, para esta subespécie de *Juniperus* a pesquisa e purificação de novas lectinas, o que já está a ser realizado, assim como, estudar o mecanismo molecular, pelo qual exibem a sua atividade antitumoral.

## 6. Referências bibliográficas

1. Petrovska BB. Historical review of medicinal plants' usage. *Pharmacogn Rev* [Internet]. 2012 Jan [cited 2017 Jun 14];6(11):1–5. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22654398>
2. Andrez J. Suplementos Alimentares: Mercado global e estratégias de Marketing [Internet]. Instituto Superior de Ciências da Saúde Egas Moniz; 2015 [cited 2017 Jun 15]. Available from: [https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/10916/1/Andrez%2C João Henrique Abel.pdf](https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/10916/1/Andrez%2C%20Jo%C3%A3o%20Henrique%20Abel.pdf)
3. Health Market Research Portugal [Internet]. Iberian Pharmaceutical Market 2016. 2016 [cited 2017 Jun 15]. p. 7. Available from: <http://www.hmr.co.com/portugal/pt/Paginas/home.aspx>
4. Alonso D, Lazarus MC, Baumann L. Effects of Topical Arnica Gel on Post-laser Treatment Bruises. *Dermatologic Surg* [Internet]. 2002 Aug 1 [cited 2017 Jun 15];28(8):686–8. Available from: <https://insights.ovid.com/pubmed?pmid=12174058>
5. Berges C, Fuchs D, Opelz G, Daniel V, Naujokat C. Helenalin suppresses essential immune functions of activated CD4+ T cells by multiple mechanisms. *Mol Immunol* [Internet]. 2009 Sep [cited 2017 Jun 15];46(15):2892–901. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589009006117>
6. Farmácias Portuguesas [Internet]. [cited 2017 Jun 15]. Available from: <https://www.farmaciasportuguesas.pt/catalogo/>
7. European Medicines Agency [Internet]. Herbal medicines for human use. 2017 [cited 2017 Jun 15]. Available from: [http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/herbal\\_search.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1d](http://www.ema.europa.eu/ema/index.jsp?curl=pages/medicines/landing/herbal_search.jsp&mid=WC0b01ac058001fa1d)
8. Rossi AB, Vergnanini AL. Cellulite: a review. *J Eur Acad Dermatol Venereol* [Internet]. 2000 Jul [cited 2017 Jun 15];14(4):251–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11204512>
9. Incandela L, Belcaro G, De Sanctis MT, Cesarone MR, Griffin M, Ippolito E, et al. Total triterpenic fraction of *Centella asiatica* in the treatment of venous hypertension: a clinical, prospective, randomized trial using a combined microcirculatory model. *Angiology* [Internet]. 2001 Oct [cited 2017 Jun 15];52 Suppl 2:61–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11666126>

10. Mohandas Rao KG, Muddanna Rao S, Gurumadhva Rao S. Centella asiatica (L.) leaf extract treatment during the growth spurt period enhances hippocampal CA3 neuronal dendritic arborization in rats. *Evid Based Complement Alternat Med* [Internet]. 2006 Sep [cited 2017 Jun 15];3(3):349–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16951719>
11. Salute M della. *Disciplina dell'impiego negli integratori alimentari di sostanze e preparati vegetali*. Disciplina dell'impiego negli integratori alimentari di sostanze e preparati vegetali. 2012.
12. Goel V, Lovlin R, Chang C, Slama J V., Barton R, Gahler R, et al. A proprietary extract from the echinacea plant (*Echinacea purpurea*) enhances systemic immune response during a common cold. *Phyther Res* [Internet]. 2005 Aug 1 [cited 2017 Jun 15];19(8):689–94. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/ptr.1733>
13. Logan JL, Ahmed J. Critical hypokalemic renal tubular acidosis due to Sjogren's syndrome: association with the purported immune stimulant echinacea. *Clin Rheumatol* [Internet]. 2003 May 1 [cited 2017 Jun 15];22(2):158–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10067-002-0671-4>
14. Heinen-Kammerer T, Holtmannspotter C, Schnabel S, Motzkat K, Kiencke P, Rychlik R. Effectiveness of echinacin in therapy of chronic recurrent respiratory disease. *Das Gesundheitswes* [Internet]. 2005 Apr [cited 2017 Jun 15];67(4):296–301. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15856390>
15. Yoshikawa T, Naito Y, Kondo M. Ginkgo Biloba Leaf Extract: Review of Biological Actions and Clinical Applications. *Antioxid Redox Signal* [Internet]. 1999 Dec 19 [cited 2017 Jun 15];1(4):469–80. Available from: <http://www.liebertonline.com/doi/abs/10.1089/ars.1999.1.4-469>
16. Kaschel R. Specific memory effects of Ginkgo biloba extract EGb 761 in middle-aged healthy volunteers. *Phytomedicine* [Internet]. 2011 Nov [cited 2017 Jun 15];18(14):1202–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711311002273>
17. Zhang W-F, Tan Y-L, Zhang X-Y, Chan RCK, Wu H-R, Zhou D-F, et al. Extract of Ginkgo biloba Treatment for Tardive Dyskinesia in Schizophrenia. *J Clin Psychiatry* [Internet]. 2011 May 15 [cited 2017 Jun 15];72(5):615–21. Available from: <http://article.psychiatrist.com/?ContentType=START&ID=10007066>
18. Jung F, Mrowietz C, Kiesewetter H, Wenzel E. Effect of Ginkgo biloba on fluidity

- of blood and peripheral microcirculation in volunteers. *Arzneimittelforschung* [Internet]. 1990 May [cited 2017 Jun 15];40(5):589–93. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2383302>
19. Ma SW, Benzie IFF, Chu TTW, Fok BSP, Tomlinson B, Critchley LAH. Effect of *Panax ginseng* supplementation on biomarkers of glucose tolerance, antioxidant status and oxidative stress in type 2 diabetic subjects: results of a placebo-controlled human intervention trial. *Diabetes, Obes Metab* [Internet]. 2008 Nov 1 [cited 2017 Jun 15];10(11):1125–7. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1463-1326.2008.00858.x>
  20. Oliynyk S, Oh S. Actoprotective effect of ginseng: improving mental and physical performance. *J Ginseng Res* [Internet]. 2013 Apr [cited 2017 Jun 15];37(2):144–66. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23717168>
  21. Reay JL, Kennedy DO, Scholey AB. Single doses of *Panax ginseng* (G115) reduce blood glucose levels and improve cognitive performance during sustained mental activity. *J Psychopharmacol* [Internet]. 2005 Jul 1 [cited 2017 Jun 15];19(4):357–65. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0269881105053286>
  22. Yokozawa T, Kobayashi T, Oura H, Kawashuma Y. Stimulation of lipid and sugar metabolism in ginsenoside-Rb2 treated rats. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* [Internet]. 1984 Mar 31 [cited 2017 Jun 15];32(7):2766–72. Available from: <http://joi.jlc.jst.go.jp/JST.Journalarchive/cpb1958/32.2766?from=CrossRef>
  23. Boyle P, Robertson C, Lowe F, Roehrborn C. Updated meta-analysis of clinical trials of *Serenoa repens* extract in the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia. *BJU Int* [Internet]. 2004 Apr 1 [cited 2017 Jun 15];93(6):751–6. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1464-410X.2003.04735.x>
  24. Sinescu I, Geavlete P, Multescu R, Gangu C, Miclea F, Coman I, et al. Long-term efficacy of *Serenoa repens* treatment in patients with mild and moderate symptomatic benign prostatic hyperplasia. *Urol Int* [Internet]. 2011 [cited 2017 Jun 15];86(3):284–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21304222>
  25. Hashemi S, Hajiani E, Sardabi E. A Placebo-Controlled Trial of Silymarin in Patients with Nonalcoholic Fatty Liver Disease Seyed. *Hepat Mon* [Internet]. 2009 [cited 2017 Jun 16];9(4):265–70. Available from: <http://hepatmon.com/479.fulltext>
  26. Gebhardt R. Oxidative Stress, Plant-Derived Antioxidants and Liver Fibrosis. *Planta Med* [Internet]. 2002 Apr [cited 2017 Jun 16];68(4):289–96. Available from:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11988849>

27. Balderer G, Borbély AA. Effect of valerian on human sleep. *Psychopharmacology (Berl)* [Internet]. 1985 Dec [cited 2017 Jun 17];87(4):406–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF00432503>
28. Bent S, Padula A, Moore D, Patterson M, Mehling W. Valerian for Sleep: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Med* [Internet]. 2006 [cited 2017 Jun 17];119:1005–12. Available from: [http://ac.els-cdn.com/S0002934306002750/1-s2.0-S0002934306002750-main.pdf?\\_tid=9f7c9c54-5352-11e7-9dd7-00000aacb362&acdnt=1497700178\\_1e81ce1e3bf473133b96107212a6655f](http://ac.els-cdn.com/S0002934306002750/1-s2.0-S0002934306002750-main.pdf?_tid=9f7c9c54-5352-11e7-9dd7-00000aacb362&acdnt=1497700178_1e81ce1e3bf473133b96107212a6655f)
29. Adams RP, Altarejos J, Fernandez C, Camacho A. The leaf essential oils and taxonomy of *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus*, subsp. *badia* (H. Gay) Debeaux, and subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. *J Essen Oil Res.* 1999;11:167–72.
30. Cavaleiro C. *Juniperus* de Portugal. In: Figueiredo A. C., Barroso, J. G., Pedro LG, editor. *Potencialidades e Aplicações das Plantas Aromáticas e Medicinais* [Internet]. 1ª. Lisboa: Edição Centro de Biotecnologia Vegetal – Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa; 2006 [cited 2017 Jun 17]. p. 55–60. Available from: [http://cbv.fc.ul.pt/PAM/PAM3\\_PAM1\\_Indice\\_Pagina\\_CBV.pdf](http://cbv.fc.ul.pt/PAM/PAM3_PAM1_Indice_Pagina_CBV.pdf)
31. Castroviejo S, Laínz M, González GL, Montserrat P, Garmendina FM, Paiva J, et al. *Flora iberica. Plantas vasculares de la Península Ibérica e Islas Baleares*. 1st ed. Castroviejo S, Laínz M, González GL, Montserrat P, Garmendina FM, Paiva J, et al., editors. Vol. I. Madrid: Real Jardín Botánico, CSIC; 1986. 181-187 p.
32. Enescu CM, Durrant TH, Caudullo G, Rigo D. *European atlas of forest tree species*. San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri A, editor. Luxembourg: Publications Office of the European Union, Luxembourg; 2016. 104 p.
33. Vilar L, Caudullo G, Rigo D. *European atlas of forest tree species*. San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri A, editor. *European Atlas of Forest Tree Species*. Luxemburg: Publications Office of the European Union, Luxembourg; 2016. 105 p.
34. Caudullo G, Rigo D. *European atlas of forest tree species*. San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri A, editor. Luxembourg: Publications Office of the European Union, Luxembourg; 2016. 106 p.
35. Gonzalez AG, Garcia-Vinas JI, Saura S, Caudullo G, Rigo D. *European atlas of*

- forest tree species. San-Miguel-Ayanz, J., de Rigo, D., Caudullo, G., Houston Durrant, T., Mauri A, editor. Luxembourg: Publications Office of the European Union, Luxembourg; 2016. 107 p.
36. Carpenter CD, O'Neill T, Picot N, Johnson JA, Robichaud GA, Webster D, et al. Anti-mycobacterial natural products from the Canadian medicinal plant *Juniperus communis*. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2012 [cited 2017 Jun 22];143:695–700. Available from: [http://ac.els-cdn.com/S0378874112005041/1-s2.0-S0378874112005041-main.pdf?\\_tid=1e7be91c-5770-11e7-876f-00000aacb362&acdnat=1498152652\\_2f94c40020061f92d24c28d52444fd11](http://ac.els-cdn.com/S0378874112005041/1-s2.0-S0378874112005041-main.pdf?_tid=1e7be91c-5770-11e7-876f-00000aacb362&acdnat=1498152652_2f94c40020061f92d24c28d52444fd11)
  37. Höferl M, Stoilova I, Schmidt E, Wanner J, Jirovetz L, Trifonova D, et al. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Juniper Berry (*Juniperus communis* L.) Essential Oil. Action of the Essential Oil on the Antioxidant Protection of *Saccharomyces cerevisiae* Model Organism. *Antioxidants* [Internet]. 2014;3:81–98. Available from: [www.mdpi.com/journal/antioxidants](http://www.mdpi.com/journal/antioxidants)
  38. Tavares L, McDougall GJ, Fortalezas S, Stewart D, Ferreira RB, Santos CN. The neuroprotective potential of phenolic-enriched fractions from four *Juniperus* species found in Portugal. *Food Chem* [Internet]. 2012 Nov [cited 2017 Jun 14];135(2):562–70. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814612008473>
  39. Taviano MF, Marino A, Trovato A, Bellinghieri V, Melchini A, Dugo P, et al. *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *oxycedrus* and *Juniperus oxycedrus* L. subsp. *macrocarpa* (Sibth. & Sm.) Ball. berries from Turkey: Comparative evaluation of phenolic profile, antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities. *Food Chem Toxicol* [Internet]. 2013 Aug [cited 2017 Jun 14];58:22–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23603383>
  40. Orhan N, Aslan M, Demirci B, Ergun F. A bioactivity guided study on the antidiabetic activity of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* L. leaves. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2012 Mar [cited 2017 Jun 14];140(2):409–15. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874112000554>
  41. Orhan N, Aslan M, Pekcan M, Orhan DD, Bedir E, Ergun F. Identification of hypoglycaemic compounds from berries of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* through bioactivity guided isolation technique. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2012 [cited 2017 Jun 8];139(1):110–8. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874111007653>
  42. Ismail A, Lamia H, Mohsen H, Bassem J. Chemical Composition of *Juniperus*

- oxycedrus L. subsp macrocarpa Essential Oil and Study of Their Herbicidal Effects on Germination and Seedling Growth of Weeds. Asian J Appl Sci [Internet]. 2011 Aug 1 [cited 2017 Jun 14];4(8):771–9. Available from: <http://www.scialert.net/abstract/?doi=ajaps.2011.771.779>
43. De Marino S, Festa C, Zollo F, Rusolo F, Capone F, Guerriero E, et al. Phytochemical profile of *Juniperus oxycedrus* ssp . *oxycedrus* berries: A new monoterpene glucoside and evaluation of the effects on cancer cell lines. *Phytochem Lett*. 2014;10:152–9.
  44. Ali MJ, Guesmi F, Harrath AH, Alwasel S, Hedfi A, Ncib S, et al. Investigation of Antiulcer and Antioxidant Activity of *Juniperus phoenicea* L. (1753) Essential Oil in an Experimental Rat Model. *Biol Pharm Bull* [Internet]. 2015 [cited 2017 Jun 7];38:1738–46. Available from: [https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/38/11/38\\_b15-00412/\\_pdf](https://www.jstage.jst.go.jp/article/bpb/38/11/38_b15-00412/_pdf)
  45. Ennajar M, Bouajila J, Lebrihi A, Mathieu F, Abderraba M, Raies A, et al. Chemical Composition and Antimicrobial and Antioxidant Activities of Essential Oils and Various Extracts of *Juniperus phoenicea* L. (Cupressaceae). *J Food Sci* [Internet]. 2009 Sep [cited 2017 Jun 7];74(7):M364–71. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1750-3841.2009.01277.x>
  46. El Jemli M, Kamal R, Marmouzi I, Zerrouki A, Cherrah Y, Alaoui K. Radical-Scavenging Activity and Ferric Reducing Ability of *Juniperus thurifera* (L.), *J. oxycedrus* (L.), *J. phoenicea* (L.) and *Tetraclinis articulata* (L.). *Adv Pharmacol Sci* [Internet]. 2016 [cited 2017 Jun 8];2016:1–6. Available from: <http://www.hindawi.com/journals/aps/2016/6392656/>
  47. Loizzo MR, Tundis R, Conforti F, Saab AM, Statti GA, Menichini F. Food Chemistry Comparative chemical composition , antioxidant and hypoglycaemic activities of *Juniperus oxycedrus* ssp . *oxycedrus* L . berry and wood oils from Lebanon. *Food Chem*. 2007;105:572–8.
  48. Karaman İ, Şahin F, Güllüce M, Öğütçü H, Şengül M, Adıgüzel A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. *J Ethnopharmacol* [Internet]. 2003 [cited 2017 Jun 8];85(2):231–5. Available from: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874103000060>
  49. Barrero AF, Quílez del Moral JF, Lara A, Herrador MM. Antimicrobial Activity of Sesquiterpenes from the Essential Oil of *Juniperus thurifera* Wood. *Planta Med* [Internet]. 2005 Jan [cited 2017 Jun 7];71(1):67–71. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2005-837753>

50. Akkol EK, Guvenc A, Yesilada E. A comparative study on the antinociceptive and anti-inflammatory activities of five *Juniperus* taxa. *J Ethnopharmacol.* 2009;125:330–6.
51. Benzina S, Harquail J, Jean S, Beauregard A-P, Colquhoun C, Carroll M, et al. Deoxypodophyllotoxin Isolated from *Juniperus communis* Induces Apoptosis in Breast Cancer Cells. *Anticancer Agents Med Chem* [Internet]. 2014 Dec 4 [cited 2017 Jun 14];15(1):79–88. Available from: <http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1871-5206&volume=15&issue=1&spage=79>
52. Nunes AFR. Purificação e avaliação de novas lectinas como ferramenta no reconhecimento de epitopos celulares glicosilados, em células tumorais do cancro do cólon. Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa; 2014.
53. Anjos RM. Identificação e caracterização de diferentes subespécies de Zimbro (*Juniperus* sp ), por análise polipeptídica v . s identificação de lectinas. Lisboa; 2017.
54. Van Damme EJM, Peumans WJ, Barre A, Rougé P. Plant Lectins : A Composite of Several Distinct Families of Structurally and Evolutionary Related Proteins with Diverse Biological Roles Plant Lectins. *CRC Crit Rev Plant Sci.* 1998;17(6):575–692.
55. Mejía EG, Prisecaru VI. Lectins as Bioactive Plant Proteins : A Potential in Cancer Treatment. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 2005;45:425–45.
56. Rudiger H, Gabius Ha-J. Plant lectins : Occurrence , biochemistry , functions and applications. *Glycoconj J.* 2001;18:589–613.
57. Ribeiro A, Catarino S, Ferreira RB. Multiple lectin detection by cell membrane affinity binding. *Carbohydr Res* [Internet]. 2012;352:206–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carres.2012.01.024>
58. Vijayan M, Chandra N. Lectins. *Curr Opin Struct Biol.* 1999;9:707–14.
59. Loris R, Hamelryck T, Bouckaert J, Wyns L. Legume lectin structure. *Biochim Biophys Acta.* 1998;1383:9–35.
60. Datta J, Datta S. Molecular recognition by plant lectins. In: Bose B, Hemantarnjan A, editors. *Developments in physiology, biochemistry and molecular biology of plants.* Nova Deli: New India Publ. Agency; 2008. p. 166–70.
61. Peumans WJ, Van Damme EJM. Lectins as Plant Defense Proteins. *Plant*

- Physiol. 1995;109:347–52.
62. Parijs J Van, Broekaert WF, Goldstein IJ, Peumans WJ. Hevein: an antifungal protein from rubber-tree(*Hevea brasiliensis*) latex. *Planta*. 1991;183:258–64.
  63. Goldstein IJ, Hollerman CE, Smith EE. Protein-Carbohydrate interaction. II. Inhibition studies on the interaction of concanavalin A with polysaccharides. *Biochemistry* [Internet]. 1965 May [cited 2017 Aug 22];4:876–83. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14337704>
  64. Van Damme EJM, Lannoo N, Peumans WJ. Plant Lectins. In 2008 [cited 2017 Sep 8]. p. 107–209. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0065229608004035>
  65. Hong M, Cassely A, Mechref Y, Novotny M V. Sugar – lectin interactions investigated through affinity capillary electrophoresis. *J Chromatogr B*. 2001;752:207–16.
  66. Sharon N, Lis H. History of lectins : from hemagglutinins to biological recognition molecules. *Glycobiology*. 2004;14(11):53–62.
  67. Albersheim P, Wolpert J. Lectin role studied in nitrogen fixation. 1975;23–4.
  68. Alen’kina SA, Bogatyrev VA, Matora LY, Sokolova MK, Chernyshova MP, Trutneva KA, et al. Signal effects of the lectin from the associative nitrogen-fixing bacterium *Azospirillum brasilense* Sp7 in bacterial – plant root interactions. *Plant Soil*. 2014;
  69. Ambrosi M, Cameron NR, Davis BG. Lectins: tools for the molecular understanding of the glycode. *R Soc Chem*. 2005;3:1593–608.
  70. Yau T, Dan X, Ng CCW, Ng TB. Lectins with Potential for Anti-Cancer Therapy. *Molecules*. 2015;20:3791–810.
  71. Mody R, Joshi S, Chaney W. Use of Lectins as Diagnostic and Therapeutic Tools for Cancer. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 1995;33:1–10.
  72. Fu L-L, Zhou C-C, Yao S, Yu J-Y, Liu B, Bao J-K. Plant lectins: Targeting programmed cell death pathways as antitumor agents. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2011;43(10):1442–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2011.07.004>
  73. Thorburn A. Death receptor-induced cell killing. *Cell Signal*. 2004;16(2):139–44.
  74. Sánchez R, Arboleda G. Mitocondria y muerte celular. *JuliO -DicieMbRe De*. 2008;6(10):101–236.

