

PAPER DETAILS

TITLE: Farkli Solventlerle Ekstrakte Edilen Ceviz Dis Kabuklarinin Bazi Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

AUTHORS: Cemhan DOGAN,Nurcan DOGAN,Serafettin ÇELİK

PAGES: 41-47

ORIGINAL PDF URL: <https://dergipark.org.tr/tr/download/article-file/448703>

Farklı Solventlerle Ekstrakte Edilen Ceviz Dış Kabuklarının Bazı Biyokimyasal Özelliklerinin Belirlenmesi

Cemhan DOĞAN¹, Nurcan DOĞAN¹, Şerafettin ÇELİK²

Bozok Üniversitesi, Boğazlıyan Meslek Yüksek Okulu, Gıda Tek. Bölümü, YOZGAT¹
Harran Üniversitesi, Ziraat Fakültesi, Gıda Mühendisliği Bölümü, ŞANLIURFA²
İletişim: cemhan.dogan@bozok.edu.tr

Özet

Bu çalışmada iki farklı ceviz türünü dış kabukları su, etanol ve metanolle ekstrakte edilmiş ve daha sonra ekstraktların toplam fenolik madde içerikleri antioksidan aktiviteleri (DPPH ve indirgeyici güç) belirlenmiştir. Buna göre ceviz dış kabukların biyoaktivitesi yüksek bir materyal olduğu sonucuna varılmıştır. Ayrıca etanol ve metanolden elde edilen ekstraktların sudan elde edilen ekstraktlara göre daha antioksidan ve fenolik madde potansiyellerinin daha iyi olduğu gözlemlenmiştir.

Anahtar Kelimeler: Ceviz, dış kabuk, antioksidan aktivite, fenolik

Determination of Some Biochemical Properties of Walnut Husk Extracted by Different Solvents

Abstract

In this study two different types of walnut husks extracted by water, ethanol and methanol and total phenolic content and then antioxidant activity (DPPH and reducing power) of these extracts were determined. Accordingly, walnut shell was concluded that a material having a high bioactivity. Also ethanol and methanol extracts have more phenolic material and antioxidant activity potential than water extract.

Keywords: walnut, husk, antioxidant activity, phenolic

Giriş

Ceviz geniş bir coğrafyada üretilen ve kullanılan değerli bir bitkidir. Gıda sektöründe genel olarak kurutulmuş iç meyvesi kullanılsa da yeşil dış kabuğu, sert kabuğu, ağacı ve yaprakları da kozmetik, eczacılık, mobilya gibi birçok sektörde yaygın olarak kullanılmaktadır (Stamper et al., 2006). Ceviz yaprakları deri iltihaplarının ve ülserin tedavisinde kullanıldığı gibi antiseptik özelliği sayesinde alternatif ve modern tıp tedavilerinde de kullanılmaktadır (Almeida et al., 2008). Ceviz sert kabukları ise hem yakıt olarak kullanılır hem de genel olarak ham yağların sudan ayrılmasında kullanılan

seperatörlerin yapısında yer alır (Srinivasan and Viraraghavan, 2008). Ceviz dış kabuklarının ise çok fazla kullanım alanı olmamakla beraber bazı geleneksel likörlerin yapımında aroma maddesi olarak kullanıldığı belirtilmiştir (Stamper et al., 2006).

Geçen yıllar içinde özellikle gıda sektöründe çeşitli amaçlar için kullanılan doğal katkılar yerlerini çoğunlukla sentetik maddelere bırakmışlardır. Bunun en önemli sebebi artan doğal hammadde maliyetleri sebebiyle kimyasal maddelerin aşırı kullanımıdır. Sentetik katkıların üretimi doğal katkılara göre çok daha karmaşık olmakta ve doğal döngülerini tamamlamaları çok uzun

sürmektedir. Bu durumun da doğa üzerinde birçok olumsuz etkisi bulunmaktadır. Ayrıca sentetik katkıların insan sağlığını da kısmen tehdit ettikleri bilinmektedir. Bütün bu sebeplerden dolayı ucuz, atık materyallerden elde edilebilecek doğal katkıların kullanımı insan sağlığı ve çevresel risklerin en aza indirilmesi açısından büyük önem arz etmektedir (Silva et al., 2004; Pulido et al., 2000; Tseng et al., 1997).

Bitkisel kayaklardan elde edilen fenol ve fenol ekstraktları antioksidan aktivite yanında antimikrobiyal etki de gösterebilmektedir, bu da onları antibiyotik ve kimyasal kullanımına karşı iyi bir alternatif yapmaktadır (Fernández et al., 1996; Hoult and Payá, 1996; Pereira et al., 2008, 2007a,b; Proestos et al., 2005). Günümüzde doğal antimikrobiyal maddelere olan ilgi her geçen gün artmaktadır. Bunun en önemli sebebi kimyasal katkılardan kaçım düşüncesiyle olan tüketici baskısıdır (Oliveira et al., 2007; Cowan, 1999).

Doğal antimikrobiyal ve antioksidanlar farklı birçok bitkisel materyalden üretilmektedir. Farklı çalışmalarda ceviz bitkisinin değişik parçalarının antioksidan ve antimikrobiyal etkilerini belirten birçok çalışmaya rastlanmıştır (Alkhawajah, 1997; Espín et al., 2000; Li et al., 2006, 2007; Pereira et al., 2007b; Pereira et al., 2008). Ancak farklı endüstri dalları dikkate alındığında ceviz dış kabuklarının doğal antimikrobiyal ve antioksidan üretiminde kaynak olarak kullanıldığına dair bir veriye rastlanmamıştır. Ayrıca ceviz dış kabuğu bazı likörlerin üretimi ve bazı seperatörlerin yapısında kullanımının dışında, ceviz bitkisi tüm olarak ele alındığında kullanım alanı en az olan materyaldir.

Bu çalışmanın amacı kullanım alanı az olan bu materyalin bazı fonksiyonel özelliklerinin belirlenmesidir. Bu nedenle iki

farklı ceviz türünün dış kabuklarından elde edilen ekstraktların antioksidan ve antimikrobiyal etkileri belirlenmiştir.

Materyal ve Metot

Yalova 1 ve Yalova 2 varyetesi ait Ceviz örnekleri Kahramanmaraş Gıda, Tarım ve Hayvancılık İl Müdürlüğü'nün yönlendirmesiyle Kahramanmaraş Merkez'e bağlı Kemal Köyü ceviz üreticisi Ferhat DAL' dan temin edilmiştir. Tüm örneklerin öncelikle araştırmaya konu olan dış kabukları çıkartılmış ve oda şartlarında, güneş görmeyecek şekilde ince bir tabaka halinde serilerek kurutulmuştur. Daha sonra örnekler değirmende çekilerek -18 °C 'de kullanılacak zamana kadar depolanmıştır.

Örneklerin ekstraksiyonu

Örneklerin ekstraksiyonunda Fernández-Agulló (2013) uyguladıkları soğuk ekstraksiyon metodu modifiye edilmiştir. Su ile yapılan ekstraksiyonlarda 10 gr örnek tartılmış ve üzerine 100 ml su eklenmiştir. Daha sonra çalkalamalı su banyosunda 60 °C 12 saat bekletildikten sonra önce kaba filtre sonra da whatman 4 filtre kâğıdından geçirilen örnekler santrifüjlenerek süpernatant alınmış ve stok çözelti olarak kullanılmıştır.

Çözgen olarak etanol ve metanol kullanılan ekstraktların elde edilmesinde 10 g örnek tartılmış 90 ml çözgen, 10 mL su ilave edilmiştir (Ön çalışmalar sonucunda rotary evaporatörde saf ekstrakt eldesi sırasında yapışma gözlemlendi için çözgene %10 su ilave edilmiştir). Daha sonra ağzı kapalı parafilmlelenmiş şekilde beherler içinde çalkalamalı su banyosunda 50 °C 12 saat bekletildikten sonra önce kaba filtre sonra da whatman 4 filtre kâğıdından geçirilen örnekler santrifüjlenerek süpernatant alınmış ve son olarak rotary evaporatörde kullanılan

çözgene göre etanol yada metanol uzaklaşana kadar vakum altında bekletilmiştir. Elde edilen ekstrakt-su karışımı stok çözelti olarak kullanılmıştır.

Fenolik madde tayini

Kabuk ekstraktların total fenolik bileşik tayini, Folin-Ciocalteu (FCR, $C_{10}H_5NaO_5S$) reaktifi ile Slinkard ve Singleton (1977)'un belirttiği metoda göre yapılmıştır. Bu amaçla her bir ekstrakttan ayrı ayrı 100 μ L (0.1 mL) alınarak 50 mL'lik balon jojelerin her birine ilave edildikten sonra buna 46 mL deiyonize su ilave edilmiştir. Daha sonra 1 mL FCR eklenmiş ve 3 dakika beklenmiştir. Son olarak 3 mL % 2'lik Na_2CO_3 ilavesi yapılmış ve karışım 2 saat bekletildikten sonra 760 nm'de absorbanslar okunmuştur. Kör numune, 1 mL FCR üzerine, 3 mL % 2'lik Na_2CO_3 eklenmiş ve 50 mL 'ye kadar distile su ile seyreltilerek hazırlanmıştır. Standardın ise (gallik asit) 0.05 mg mL⁻¹, 0.1 mg mL⁻¹, 0.25 mg mL⁻¹, 0.5 mg mL⁻¹ ve 1 mg mL⁻¹'lik çözeltileri hazırlanmıştır. Ortamda fenolik maddenin bulunması durumunda FCR ilavesiyle 760 nm'de maksimum absorbans veren ürünler oluşmaktadır. Absorbanstaki artış fenolik madde miktarıyla orantılıdır. Seyreltilmiş edilmiş ekstrakttaki fenolik madde miktar tayini standart gallik asit grafiğinden elde edilen oranlarla gallik asit eş değerlikli olarak aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

Absorbans = $0.001 \times \text{Total fenol [gallik asit eş değerlikli } (\mu\text{g})] - 0.0154$ (grafik formülasyonundaki c sabiti)

DPPH serbest radikali söndürme aktivite testi

Kabuklardan elde edilen ekstraktların DPPH radikali söndürme aktivitesi Blois (2002) metoduna göre yapılmıştır. Bu deneyde her bir tüpe 0,1 mM DPPH'ın metanol çözeltisinden 1 mL alınarak, daha

önce 3 mL olarak farklı konsantrasyonlarda hazırlanmış (1-10 mg mL⁻¹) kabuk ekstraktlarını içeren tüplere ilave edilmiştir. Çözelti vortexlenerek ışık görmeyecek şekilde karanlık bir ortamda 30 dk süreyle oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldıktan sonra 517 nm'de absorbanslar ölçülmüştür. Kör olarak kullanılan çözeltiye sadece 4 mL metanol, kontrol çözeltisi için ise 1 mL DPPH üzerine 3 mL metanol ilave edilerek hazırlanmıştır. Hazırlanan DPPH çözeltisi 517 nm'de maksimum absorbans değeri veren koyu mor bir renk oluşturmaktadır. Bu DPPH çözeltisi antioksidan madde veya maddeler içeren bir solüsyona katıldığında bu koyu mor renk zamanla rengini kaybetmeye başlar. Bu da antioksidan maddelerin DPPH radikalini söndürdüğünün kanıtıdır. Bu işlemi de ya ondan hidrojen atomu kopararak ya da ona elektron vererek gerçekleştirir. Böylece onları renksiz ve ağartılmış moleküller haline getirirler (2,2-difenil-1-hidrazin veya hidrazinin farklı analogları). Bu da 517 nm'de absorbans değerinin azalmasına yol açar. Absorbans değerindeki en hızlı azalma, en iyi antioksidan potansiyelinin göstergesidir. DPPH serbest radikalini söndürme yüzdesi aşağıdaki formüle göre hesaplanmıştır.

Yüzde inhibisyon = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100$
(A_0 : Kontrol Absorbans , A_1 : Numune Absorbans)

Hesaplanan yüzdeler kullanılarak oramdaki DPPH serbest radikalinin %50'ünü süpüren konsantrasyon EC50 değeri olarak verilmiştir (EC50 değeri hesaplanırken Microsoft Excel' de çizilen lineer regresyon eğrisi kullanılmıştır.)

İndirgeyici güç aktivite testi

Çalışılan kabuklardan elde edilen ekstraktların indirgeyici gücü Oyaizu

(1986)'ya göre belirlenmiştir. Burada farklı konsantrasyonlarda (1-10 mg mL⁻¹) hazırlanan ekstraktlardan 1 mL alınarak üzerine 2.5 mL 200mM potasyum hidrojen fosfat (KH₂PO₄) tampon (pH: 6,6) ve %1' lik 2,5 mL potasyum ferrisiyanür (K₃Fe(CN)₆) çözeltileri ilave edilerek 50 °C' de 20 dakika etüvde bekletilmiştir. Bu sürenin sonunda etüvden çıkarılan çözeltiler üzerine 2.5 mL %10' luk TCA ilave edildikten sonra, 200 rpm'de 10 dk. santrifüj edilmiştir. Santrifüjlenen çözeltilerin süpernatant kısmından 2.5 mL alınarak üzerine 2.5 mL distile su ve 0.5 mL % 0.1'lik FeCl₃ (ferric chloride) çözeltisi ilave edilmiştir. Daha sonra UV-Vis spektroskopisinde 700 nm'de numunelerin absorbansları ölçülmüştür. Deneyde, kör çözelti; ekstrakt içermeyen 2.5 ml fosfat tamponu üzerine 2.5 ml K₃Fe(CN)₆ eklenerek 20 dakika 50 °C'de bekletilmiş daha sonra bu çözeltinin üzerine 2.5 mL TCA eklenerek, bu karışımdan 1 mL alınmış ve alınan bu çözelti üzerine 1 ml FeCl₃ ilave edilerek hazırlanmıştır. Başlangıçta oluşan (Fe³⁺) ferrisiyanid kompleksi sarı renkte bir solüsyon oluşumuna neden olmaktadır. Ortamdaki antioksidanlar, ferrisiyanid kompleksine elektron vererek, bu bileşiği indirgemekte ve böylece (Fe²⁺) ferrosiyanür oluşumuna neden olarak, solüsyonun renginin yeşil ve mavinin farklı tonlarına

dönüşmesine yol açarak 700 nm' de maksimum absorbans vermesini sağlamaktadır. Ortamdaki antioksidanların indirgeyici güçlerine bağlı olarak, 700 nm'deki absorbans değerinin artması ekstraktların indirgeyici gücünün göstergesidir.

İstatistik analiz

Elde edilen verilere SPSS 17.0 programı kullanılarak tek yönlü anova analizi yapılmış ve örnekler arasında oluşan farklılıklar Tukey çoklu karşılaştırma testi ile belirlenmiştir.

Araştırma Bulguları ve Tartışma

Fenolik madde miktarı

Ceviz Örneklerin Folin Ciocalteu metoduna göre yapılan analizde toplam fenolik madde miktarları mg Gallik asit ekvivalent g ekstrakt⁻¹ cinsinden Çizelge 1.1'de verilmiştir. Buna göre örnekler arasında varyete açısından istatistiksel bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Değerler ekstraksiyonda kullanılan solventler açısından incelendiğinde istatistiksel olarak farklılıklar tespit edilmiştir. Her iki varyete açısından fenolik madde miktarında yüksek etkinlikten düşük etkinliğe göre sıralama metanol, etanol ve su şeklinde olmuştur.

Çizelge 1. Deneme materyali örneklerine ait toplam fenolik madde miktarları (mg GAE g ekstrakt⁻¹)

	Örnek	Su	Etanol	Metanol
Ceviz	c1	44.34±3.45 ^{A*}	67.12±7.84 ^B	73.16±7.14 ^C
	c2	48.91±5.12 ^A	63.81±6.26 ^B	69.18±8.18 ^B

*Aynı satırlarda farklı büyük harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemlidir (p<0.05).

(c1: Yalova 1 Ceviz, c2 Yalova 2 Ceviz)

DPPH serbest radikali söndürme aktivitesi sonuçları

Örneklerden elde edilen ekstraktların DPPH serbest radikalini söndürme aktivitelerinin belirlenmesi sonucu elde edilen % söndürme aktivitesi lineer regresyon analizine tabi tutulup EC_{50} değeri hesaplanmıştır. Buna göre yapılan analizde ortaya çıkan EC_{50} değerleri mg ekstrakt mL^{-1} cinsinden Çizelge 2’de verilmiştir. Buna göre örnekler arasında varyete açısından istatistiksel bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Değerler kullanılan solvent bakımından incelendiğinde iki farklı grubun olduğu

gözlenmiştir. Etanol ve metanol solventleri kullanılan örneklerin EC_{50} değerlerinde önemli bir farklılık tespit edilmemiştir. Bununla birlikte su kullanılan örneklerde ise diğer solventlere göre önemli bir artış tespit edilmiştir. EC_{50} değeri ortamdaki DPPH radikalinin yarısını süpürmek için gerekli olan konsantrasyon oranının ifadesidir. Bu nedenle EC_{50} değeri ne kadar düşük olursa antioksidan kapasite o ölçüde artmaktadır. Sonuçlar incelendiğinde antioksidan kapasite açısından suyun diğer solventlere kıyasla daha düşük potansiyelli bir solvent olduğu görülmüştür.

Çizelge 2. Deneme materyali örneklerine ait DPPH EC_{50} değerleri (mg ekstrakt mL^{-1})

	Örnek	Su	Etanol	Metanol
Ceviz	c1	$0.96 \pm 0.03^{B*}$	0.62 ± 0.02^A	0.65 ± 0.03^A
	c2	0.89 ± 0.04^B	0.70 ± 0.06^A	0.72 ± 0.02^A

* Aynı satırlarda farklı büyük harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemlidir ($p < 0.05$).
(c1: Yalova 1 Ceviz, c2 Yalova 2 Ceviz)

İndirgeyici güç kapasitesi sonuçları

Örneklerden elde edilen ekstraktların ferrisiyanid kompleksini indirgeme güçlerinin belirlenmesi için yapılan spektral analiz sonucu absorbans değerleri ortaya çıkmıştır. Elde edilen absorbans değerleri ve konsantrasyon ilişkisi lineer regresyon analizine tabi tutulup 0.5 absorbansı veren konsantrasyon EC_{50} değeri olarak ifade edilmiştir. Buna göre yapılan analizde ortaya çıkan EC_{50} değerleri mg ekstrakt mL^{-1} cinsinden Çizelge 3’de verilmiştir. Buna göre

örnekler arasında varyete açısından istatistiksel bir fark olmadığı gözlemlenmiştir. Değerler ekstraksiyonda kullanılan solventler açısından incelendiğinde istatistiksel olarak farklılıklar tespit edilmiştir. Her iki varyete açısından da tüm solvent grupları arasında önemli farklılıklar tespit edilmiştir. Solventlerin indirgeme gücüne etki potansiyelleri kıyasladığında en yüksek potansiyelin etanolde, sonra metanolde daha sonra da suda olduğu tespit edilmiştir.

Çizelge 3. Deneme materyali örneklerine ait indirgeyici güç EC_{50} değerleri (mg ekstrakt mL^{-1})

	Örnek	Su	Etanol	Metanol
Ceviz	c1	$2.75 \pm 0.19^{C*}$	1.51 ± 0.12^A	1.65 ± 0.27^B
	c2	2.67 ± 0.23^C	1.62 ± 0.16^A	1.76 ± 0.19^B

* Aynı satırlarda farklı büyük harfle ifade edilen değerler arasındaki farklar önemlidir ($p < 0.05$).
(c1: Yalova 1 Ceviz, c2 Yalova 2 Ceviz)

Çalışmada kullanılan örneklerin göstermiş olduğu indirgeyici güç aktivitesi, bunların içerdiği redükthanlarla ilişkili olabilmektedir. Çünkü bu redükthanlar serbest radikallere

hidrojen atomu vermek suretiyle reaksiyona girerek radikal zincir reaksiyonlarını sonlandırmakta ve dolayısıyla serbest radikal zincirlerin kırılmasına yol açarak antioksidan

aktivite sergilemektedirler (Ferreira ve ark. 2007). Örneklerin indirgeyici güç kapasitelerinin hidrojen verebilme kabiliyetlerine bağlı olduğu, bunda redüktan içeriğiyle doğru orantılı olduğu belirtilmektedir (Yang ve ark. 2002).

Sonuçlar

Sonuç olarak ülkemizde yetişen iki farklı ceviz kabuğun fenolik madde miktarları ve antioksidan özellikleri incelendiğinde örneklerde önemli oranlarda biyoaktivite potansiyelinin olduğu gözlemlenmiştir. En yüksek ekstraksiyon verimliliği her ne kadar su ile elde edilmiş olsa da bu ekstraktlar diğer solventlere nazaran daha düşük antioksidan aktivite göstermişlerdir. Ölçülen en yüksek fenolik madde miktarı ve antioksidan etki (DDPH ve indirgeyici güç) sırasıyla c1 örneğinden metanolla elde edilen ve c1 örneğinde etanolla elde edilen ekstraktlara aittir. Elde edilen sonuçlar ceviz dış kabuklarının gıda sanayisinin farklı alanlarında kullanım potansiyeli bulunan ekonomik bir kaynak olabileceğini göstermiştir. Ayrıca bu potansiyel ekstraksiyon işlemi ve kalitesini optimize etmek amacı ile sıcaklık, zaman, basınç ve bazı özel şartlar üzerine yapılacak yeni çalışmalarla arttırılabilir.

Kaynaklar

- Alkhawajah, A.M., 1997. Studies on the antimicrobial activity of *Juglans regia*. Am. J. Chinese Med. 2008 (25), 175–180.
- Almeida, I.F., Fernandes, E., Lima, J.L.F.C., COSTA, P.C., BAHIA, M.F., 2008. Walnut (*Juglans regia*) leaf extracts are strong scavenger of pro-oxidant reactive species. Food Chemistry 106, 1014–1020.
- Blois, M. S., 2002,. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature , 26, 1199–1200.
- Clark, A.M., Jurgens, T.M., Hufford, C.D., 1990. Antimicrobial activity of juglone. Phytother. Res. 4, 11–14.
- Cowan, M.M., 1999. Plant products as antimicrobial agents. Clin. Microbiol. Rev. 12, 564–582.
- Espín, J.C., Soler-Rivas, C., Wichers, H.J., 2000. Characterization of the total free radical scavenger capacity of vegetable oils and oil fractions using 2,2-diphenyl- 1-picrylhydrazyl radical. J. Agric. Food Chem. 48, 648–656.
- Fernández, M., Garcia, M., Sáenz, M., 1996. Antibacterial activity of the phenolic acid fraction of *Scrophularia frutescens* and *Scrophularia sambucifolia*. J. Ethnopharmacol. 53, 11–14.
- Fernandez-Agulloa, A., Pereirab, E., Freire , M.S., Valentaoc, P., Andradec, P.B., Gonzalez-Alvareza, J., Pereirab, J.A., 2013. Influence of Solvent on the Antioxidant and Antimicrobial Properties of Walnut (*Juglans Regia* L.) Green Husk Extracts. Industrial Crops and Products 42 126– 132.
- Ferreira, I.C.F.R., Baptista, P., Vilas-Boas, M., Barros, L. 2007.Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. Food Chemistry, 100, 1511-1516.
- Hoult, J., Payá, M., 1996. Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: natural products with therapeutic potential. Gen. Pharmacol. 27, 713–722
- Li, L., Tsao, R., Yang, R., Liu, C.M., Zhu, H.H., Young, J.C., 2006. Polyphenolic profiles

- and antioxidant activities of heartnut (*Juglans ailanthifolia* var. *cordiformis*) and Persian walnut (*Juglans regia* L.). *J. Agric. Food Chem.* 54, 8033–8040.
- Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L., Pereira, J.A., 2007. Hazel (*Corylus avellana* L.) leaves as source of antimicrobial and antioxidative compounds. *Food Chem.* 105, 1018–1025.
- Oyaizu, M. 1986, Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44,307-315.
- Pereira, A.P., Ferreira, I.C.F.R., Marcelino, F., Valentão, P., Andrade, F., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., Pereira, J.A., 2007a. Phenolic compounds and antimicrobial activity of olive (*Olea europaea* L. Cv. *Cobrançosa*) leaves. *Molecules* 12, 1153–1162.
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Ferreira, I.C.F.R., Bento, A., Estevinho, L., 2008. Bioactive properties and chemical composition of six walnut (*Juglans regia* L.) cultivars. *Food Chem. Toxicol.* 46, 2103–2111
- Pereira, J.A., Oliveira, I., Sousa, A., Valentão, P., Andrade, P.B., Ferreira, I.C.F.R., Ferreres, F., Bento, A., Seabra, R., Estevinho, L., 2007b. Walnut (*Juglans regia* L.) leaves: phenolic compounds, antimicrobial activity and antioxidant potential of different cultivars. *Food Chem. Toxicol.* 45, 2287–2295.
- Proestos, C., Chorianopoulos, N., Nychas, G.-J.E., Komaitis, M., 2005. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. *J. Agric. Food Chem.* 53, 1190–1195
- Pulido, R., Bravo, L., Saura-Calixto, F., 2000. Antioxidant activity of dietary polyphenols as determined by a modified ferric reducing/antioxidant power assay. *J. Agric. Food Chem.* 2000 (48), 3396–3402.
- Silva, B.M., Andrade, P.B., Valentão, P., Ferreres, F., Seabra, R.M., Ferreira, M.A., 2004. Quince (*Cydonia oblonga* Miller) fruit (pulp, peel, and seed) and jam: antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 52, 4705–4712
- Slinkard, K.; Singleton, V. L. 1977, Total phenol analyses: Automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, , 28, 49-55.
- Srinivasan, A., Viraraghavan, T., 2008. Removal of oil by walnut shell media. *Bioresource Technology* 99, 8217–8220.
- Stampar, F., Solar, A., Hudina, M., Veberic, R., Colaric, M., 2006. Traditional walnut liqueur-cocktail of phenolics. *Food Chemistry* 95, 627–631.
- Tseng, T.-H., Kao, E.-S., Chu, C.-Y., Chou, F.-P., Lin Wu, H.-W., Wang, C.-J., 1997. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. Against oxidative stress in rat primary hepatocytes. *Food Chem. Toxicol.* 35, 1159–1164.
- Yang, J.H., Lin, H.C., Mau, J. L. 2002. Antioxidant properties of several commercial mushrooms. *Food Chem.*, 77, 229–235