

**Eduardo Miguel das Neves Silva Vicente**

**Quantificação e classificação do teor de antocianinas e suas actividades biológicas em três variedades de *Hibiscus rosasinensis* L.**



Universidade do Algarve  
Faculdade de Ciências e Tecnologia  
2018

**Eduardo Miguel das Neves Silva Vicente**

**Quantificação e classificação do teor de antocianinas e suas actividades biológicas em três variedades de *Hibiscus rosa-sinensis* L.**

Mestrado em Hortofruticultura  
Dissertação orientada por:  
Professora Doutora Maria Graça Miguel



Universidade do Algarve  
Faculdade de Ciências e Tecnologia  
2018

## **Declaração de autoria de trabalho**

“Declaro ser o autor deste trabalho, que é original e inédito. Autores e trabalhos consultados estão devidamente citados no texto e constam da listagem de referências incluída.”

---

(Eduardo Miguel das Neves Silva Vicente)

“Copyright” por Eduardo Miguel das Neves Silva Vicente

“A universidade do Algarve tem o direito, perpétuo e sem limites geográficos, de arquivar e publicar este trabalho através de exemplares impressos reproduzidos em papel ou de forma digital, ou por qualquer outro meio conhecido ou que venha a ser inventado, de o divulgar através de repositórios científicos e de admitir a sua cópia e distribuição com objetivos educacionais ou de investigação, não comerciais, desde que seja dado crédito ao autor e editor.”

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à Professora Doutora Maria Graça Miguel por me ter orientado durante todo o processo desta dissertação, desde a escolha do tema até ao último parágrafo escrito; e por toda a ajuda e conhecimento dado neste longo percurso.

Quero também agradecer à Prof. Doutora Cristina Barrocas Dias bem como à Doutora Ana Manhita, do Laboratório Hércules, da Universidade de Évora as análises químicas das amostras de hibisco para a identificação das antocianinas.

Por fim, agradeço ainda aos meus pais pelo suporte e apoio dado durante todo o meu percurso universitário, e aos meus colegas Rui Antão e Sabrina Sayers pelo auxílio em diversos momentos no processo de elaboração desta dissertação.

## Resumo

As antocianinas são dos pigmentos naturais mais importantes e estudados, apresentando enormes benefícios para as plantas (protecção contra factores de risco), assim como para o Homem ao consumi-las. Vários estudos têm mostrado que extractos de diferentes órgãos vegetativos da espécie *Hibiscus rosa-sinensis* L. (Família Malvaceae) apresentam propriedades farmacológicas e medicinais; o que ajuda ao tratamento de diversos sintomas, doenças e/ou na prevenção de determinadas patologias.

Nesta dissertação analisaram-se extractos das flores de 3 variedades de *H. rosa-sinensis* (flor vermelha, rosa e laranja) em 3 solventes de extracção [água, metanol acidulado com ácido clorídrico (0,1 %) e metanol acidulado com ácido cítrico (4%)] com o objectivo de avaliar determinadas propriedades biológicas nas três variedades bem como o efeito do tipo de solvente de extracção nestes atributos. A identificação dos pigmentos nas flores das três variedades foi também determinada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa. Os resultados mostraram que a variedade e o tipo de solvente de extracção usados determinaram concentrações diferentes quer dos fenóis quer das antocianinas totais, bem como diferenças nas actividades biológicas determinadas. Por exemplo, o extracto metanólico acidulado com ácido clorídrico (0,1%) da flor rosa em (HClRos) apresentou concentrações mais elevadas de fenóis e antocianinas totais, bem como maior capacidade antioxidante e actividade inibidora de xantina oxidase (XO) e  $\alpha$ -amilase; mostrando uma positiva e significativa correlação entre o teor de antocianinas e algumas das actividades biológicas analisadas. Foram seis as antocianinas identificadas nesta variedade (cianidina-3,5-*O*-diglucósido, cianidin-3-*O*-sambubiósido, cianidina-3-*O*-glucósido, delphinidina-3-*O*-(feruloil)ramnósido, delphinidina-3-*O*-sambubiósido, cianidina-3-*O*-(dixiloxi)glucósido. Nas restantes duas variedades, estas duas últimas antocianinas não foram detectadas.

**Palavras-chave:** Hibisco; flor; pigmentos; inibição enzimática; capacidade antioxidante; actividade antidiabética; actividade anti-inflamatória.

## Abstract

Anthocyanins are one of the most important and studied natural pigments, presenting several benefits for plants (protection against risk factors) and for humans, through consumption. Several studies showed that different extracts from different parts of the specie *Hibiscus rosa-sinensis* L. (Family Malvaceae) have pharmacological and medicinal properties, which help in the treatment of several diseases, symptoms and/or prevention of some pathologies.

In this dissertation, extracts of 3 varieties of *H. rosa-sinensis* (red, pink and orange flower) in 3 different solvent extracts [water, methanol acidified with chloridic acid (0,1 %) and methanol acidified with citric acid (4 %)] were studied with the purpose of the evaluation of some biological properties and the effect of the solvent extract on these attributes. Liquid chromatography-mass spectrometry was used to identify the pigments present in these 3 varieties. The results showed that the flower variety and type of solvent used had different concentrations of phenol and total anthocyanins, and differences in biological activities. For example, the pink flower in methanol acidified with chloridic acid (0,1 %) extract (HClRos) presented the highest concentration of phenol, total anthocyanins, antioxidant capacity, inhibition of xantina oxidase (XO) and  $\alpha$ -amylase activity; and showed a positive and significant correlation between anthocyanin concentration and some of the biological activities analysed. Six anthocyanins were identified in this variety (cyanidin-3,5-O-diglucoside, cyanidin-3-O-sambubioside, cyanidin-3-O-glucoside, delphinidin-3-O-(feruloyl)rhamnoside, delphinidin-3-O-sambubioside and cyanidin-3-O-(dixyloxy)glucoside). In the other two varieties, the last two anthocyanins were not detected.

**Keywords:** Hibiscus; flower; pigments; enzymatic inhibition; antioxidant capacity; antidiabetic activity; anti-inflammatory activity.

## Lista de abreviaturas

- AAE** – *Acid Ascorbic Equivalent* (Equivalente em ácido ascórbico)
- ABTS** – 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
- AcE** – *Acarbose Equivalent* (Equivalente em acarbose)
- AchE** – Acetilcolinesterase
- ACiLar** – Extracto em ácido cítrico mais metanol de flor laranja
- ACiRos** – Extracto em ácido cítrico mais metanol de flor rosa
- ACiVer** – Extracto em ácido cítrico mais metanol de flor vermelha
- ADN** – Ácido desoxirribonucleico
- AIE** – *Alopurinol Equivalent* (Equivalente em alopurinol)
- AquLar** - Extracto aquoso de flor laranja
- AquRos** - Extracto aquoso de flor rosa
- AquVer** – Extracto aquoso de flor vermelha
- BSA** - *Bovine Serum Albumin*
- c-3-g** – Cianidina-3-glucósido
- c-3-gE** – *Cianidina-3-glucósido Equivalent* (Equivalente em cianidina-3-glucósido)
- CAE** – *Citric Acid Equivalent* (Equivalente em ácido cítrico)
- DMSO** – Dimetilsulfóxido
- DPPH** - *2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl*
- EDTA** – Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
- EDTAE** – *EDTA Equivalent* (equivalente em EDTA)
- ESI** -*Electrospray Ionisation*
- FW** – *Fresh Weight* (Peso fresco)
- GAE** – *Gallic Acid Equivalent* (Equivalente em ácido gálico)
- IC<sub>50</sub>** – *Half maximal inhibitory concentration* (concentração inibidora de 50%)
- HCiLar** – Extracto em ácido clorídrico mais metanol de flor laranja
- HCiRos** – Extracto em ácido clorídrico mais metanol de flor rosa
- HCiVer** – Extracto em ácido clorídrico mais metanol de flor vermelha
- HPLC** – *High-Performance Liquid Chromatography* (Cromatografia líquida de alta eficiência)
- HPLC-PDA-ESI-MS** - *High-Performance Liquid Chromatography - Photodiode Array Detector - Electrospray Ionisation - Mass Spectrometry*
- MS** – *Mass Spectrometry* (Espectrometria de massa)

**NADH** - *Nicotinamide adenine dinucleotide* reduzido

**NBT** – *Nitroblue Tetrazolium*

**PDA** - *Photodiode Array Detector*

**PMS** - *Phenazine Methosulfate*

**PPHG** - *Postprandial hyperglycemia*

**PTFE** – Politetrafluoretileno

**RNA**- Ácido ribonucleico

**SOD** - Superóxido Dismutase

**Trolox** - *6-Hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid*

**UV-B** – Raio UltraVioleta tipo B

**XO** – Xantina-Oxidase

## Índice de figuras

**Figura 1.** Anel pirrólico (lado esquerdo). Anel porfirina (lado direito), constituído por 4 anéis pirrólicos, ligados entre si por pontes metálicas.

**Figura 2.** Molécula da hemoglobina humana (esquerda) e clorofila (direita); dois derivados de tetrapirrole, que são duas porfinas ligadas a iões metálicos.

**Figura 3.** Estrutura molecular do isopreno.

**Figura 4.** Estrutura molecular do licopeno.

**Figura 5.** Estrutura molecular do  $\beta$ -caroteno.

**Figura 6.** Estrutura molecular do ácido betalâmico ( $C_9H_9NO_5$ ), base de todas as betalaínas, betaxantinas e betacianinas.

**Figura 7.** Estrutura molecular base de todas as antocianidinas.

**Figura 8.** Diferentes etapas da primeira fase da biossíntese de antocianinas: formação dos precursores gerais de fenilpropanóides.

**Figura 9.** Segunda fase da biossíntese de antocianinas: as etapas específicas que levam à sua formação (Adaptado de Aza-González *et al.*, 2012).

**Figura 10.** Esquema representativo de todos os órgãos vegetativos do *Hibiscus rosa-sinensis* L. (Gupta, desconhecido).

**Figura 11.** Três variedades de *Hibiscus rosa-sinensis* L. utilizadas no ensaio: cor rosa (esquerda), laranja (centro), e vermelha (direita).

**Figura 12.** Teor de fenóis totais nos 9 extractos florais de hibisco (Barras significam desvio-padrão  $n = 3$ ).

**Figura 13.** Teor de antocianinas totais nos 9 extractos florais de hibisco (Barras significam desvio-padrão  $n = 3$ ).

**Figura 14.** Perfil cromatográfico dos extractos florais de hibisco: A (HCIRos); B (HCIVer); C (HCILar).

**Figura 15.** Actividade antioxidante determinada pelo método ABTS de 9 extractos florais de hibisco, expressa em valores de  $IC_{50}$  (mg/ml) (Barras significam desvio-padrão  $n = 3$ ).

**Figura 16.** Poder redutor dos nove extractos florais e do ácido ascórbico.

**Figura 17.** Actividade quelante de 6 extractos florais de hibisco expressa em g equivalente EDTA/g massa seca. (Barras significam desvio-padrão  $n = 3$ ).

**Figura 18.** Capacidade de captar radical superóxido dos 8 extractos florais de hibisco, expressa em grama equivalente em ácido ascórbico/g de massa seca de extracto (Barras significam desvio-padrão  $n = 3$ ).

**Figura 19.** Actividade anti-inflamatória dos extractos florais de hibisco avaliada através do método da inibição da desnaturação da albumina, expressa em IC<sub>50</sub> (mg/ml). (Barras significam desvio-padrão n = 3).

**Figura 20.** Actividade inibitória dos 9 extractos florais de hibisco na xantina oxidase (XO) expressa em g ALE/100 g massa seca. (Barras significam desvio-padrão n = 3).

**Figura 21.** Actividade inibitória dos extractos florais de hibisco na  $\alpha$ -amilase, expressa em mg AcE/g massa seca,. (Barras significam desvio-padrão n = 3).

**Figura 22.** Actividade inibitória dos 7 extractos florais de hibisco na  $\alpha$ -glucosidase expressa em IC<sub>50</sub> (mg/ml). (Barras significam desvio-padrão n = 3).

**Figura 23.** Actividade inibitória dos 5 extractos florais de hibisco na acetilcolinesterase expressa em mg galantamina equivalente/g massa seca. (Barras significam desvio-padrão n = 3).

**Figura 24.** Actividade inibitória dos extractos florais de hibisco na tirosinase expressa em IC<sub>50</sub> (mg/ml). (Barras significam desvio-padrão n = 3).

## Índice de tabelas

**Tabela 1.** Antocianidinas mais comuns que ocorrem naturalmente, com a posição de substituição e a cor produzida (Gould et al., 2009).

**Tabela 2.** Valores das médias obtidas (n=3) de fenóis totais (g GAE/100 g massa seca) para cada extracto e os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 3.** Valores das médias obtidas (n=3) de antocianinas totais (mg c-3-gE/g massa seca) para cada extracto com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $P < 0.05$ ).

**Tabela 4.** Identificação das antocianinas nos três extractos florais de hibisco usando HPLC - PDA - ESI - MS em modo positivo.

**Tabela 5.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto no método ABTS ( $IC_{50}$  (mg/ml)), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 6.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto no método do poder quelante (g EDTAE/g massa seca), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 7.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto no método superóxido (g AAE/g massa seca), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 8.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto no método de avaliação de captação se radicais superóxido ( $IC_{50}$  (mg/ml)), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 9.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto na avaliação da capacidade inibitória das amostras na xantina oxidase (g AIE/100 g massa seca), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 10.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto na inibição da  $\alpha$ -amilase (mg AcE/g massa seca), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0.05$ ).

**Tabela 11.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto na inibição da  $\alpha$ -glucosidase ( $IC_{50}$  (mg/ml)), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 12.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto na inibição da acetilcolinesterase (mg GaE/g massa seca), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 13.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto na inibição da tirosinase ( $IC_{50}$  (mg/ml)), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ ).

## Índice geral

Agradecimentos	IV
Resumo	V
Abstract	VI
Lista de abreviaturas	VII
Índice de figuras	IX
Índice de tabelas	XI
<b>1. Introdução</b>	<b>1</b>
1.1 Definição e classificação dos pigmentos	1
1.1.1 Breve descrição: Derivados de tetrapirrólicos	2
1.1.2 Breve descrição: Derivados de isoprenóides	3
1.1.3 Breve descrição: Compostos N-heterociclicos diferentes dos tetrapirróis	4
1.1.4 Breve descrição: Derivados de benzopirenos	5
1.1.5 Breve descrição: Quinonas	5
1.1.6 Breve descrição: Melaninas	5
1.2 Antocianinas	6
1.2.1 Introdução	6
1.2.2 Função das antocianinas nos diferentes órgãos vegetativos	6
1.2.2.1 Reacção das antocianinas a factores de stress	7
1.2.2.2 Foto-protecção conferida pelas antocianinas	7
1.2.2.3 Protecção contra raios UV	8
1.2.2.4 Propriedades antioxidante	8
1.2.3 Importância na reprodução vegetativa	8
1.2.4 Tipos de antocianinas: Biossíntese de antocianinas	9
1.2.5 Função das antocianinas nos frutos	11
1.2.6 Possíveis utilizações das antocianinas	12
1.2.7 Métodos de extracção e análise	14
1.3 <i>Hibiscus rosa-sinensis</i> L.	15
1.3.1 Introdução e classificação botânica	15
1.3.2 Propriedades químicas e farmacológicas	15
1.4 Objectivos	17

<b>2. Metodologia</b>	18
2.1 Preparação dos extractos florais	18
2.2 Determinação dos fenóis totais	19
2.3 Determinação das antocianinas totais	19
2.4 Identificação das antocianinas	20
2.5 Actividade antioxidante dos extractos florais	20
2.5.1 Capacidade de captar os radicais ABTS	20
2.5.2 Poder redutor	21
2.5.3 Actividade quelante de iões metálicos	21
2.5.4 Capacidade para captar os radicais anião superóxido	22
2.6 Capacidade anti-inflamatória dos extractos florais	23
2.6.1 Inibição da desnaturação da albumina	23
2.6.2 Actividade inibidora de 5-lipoxigenase	23
2.7 Actividade inibidora de xantina-Oxidase (XO)	24
2.8 Actividade inibidora de $\alpha$ -amylase	24
2.9 Actividade inibidora de $\alpha$ -glucosidase	25
2.10 Actividade inibidora de acetilcolinesterase (AChE)	26
2.11 Actividade inibidora de tirosinase	26
2.12 Análise estatística	27
<b>3. Resultados e discussão</b>	28
3.1 Concentração de fenóis totais e antocianinas totais nos extractos	28
3.2. Identificação das antocianinas nos extractos florais	31
3.3. Capacidade antioxidante dos extractos florais	33
3.3.1. Capacidade de captar os radicais ABTS	33
3.3.2 Poder redutor	35
3.3.3 Actividade quelante de iões metálicos	37
3.3.4 Capacidade para captar os radicais anião superóxido	38
3.4. Actividade anti-inflamatória	40
3.4.1. Inibição da desnaturação da albumina	41
3.4.2. Actividade inibidora de 5-lipoxigenase	43
3.5. Actividade inibidora de Xantina-Oxidase (XO)	43
3.6. Actividade antidiabética	45

3.6.1. Actividade inibidora da $\alpha$ -amilase	45
3.6.2. Actividade inibidora da $\alpha$ -glucosidase	47
3.7. Actividade inibidora de acetilcolinesterase	48
3.8. Actividade inibidora de tirosinase	50
<b>4. Conclusão</b>	<b>52</b>
<b>5. Perspectivas futuras</b>	<b>53</b>
<b>6. Referências bibliográficas</b>	<b>54</b>

# 1. Introdução

Os pigmentos estão presentes em todas as matérias e seres vivos, providenciando cores atractivas e funções básicas no desenvolvimento dos organismos, sendo as plantas os principais produtores. O ser humano, assim como a maioria dos animais, contacta com o meio envolvente através da coloração, podendo levar à sua atracção ou repulsa (Delgado-Vargas et al., 2000).

Nas plantas, os pigmentos podem encontrar-se nas folhas, frutos, flores, caules e raízes. Nos animais, os pigmentos podem ocorrer na pele, olhos ou outras estruturas. Algas, fungos e bactérias também podem apresentar pigmentos na sua constituição (Frick e Meggos, 1988).

Pigmentos naturais ou sintéticos são usados na medicina, alimentação, vestuário, mobiliário, cosmética, e em outros tantos produtos. No entanto, os pigmentos naturais podem possuir outras propriedades para além da coloração conferida. Não haveria fotossíntese, e consequentemente, não haveria a vida como a conhecemos, se não existisse clorofilas e carotenóides. Nos animais, como seria feito o transporte de oxigénio e dióxido de carbono sem as hemoglobinas ou mioglobinas? As melaninas, que actuam como protector solar na pele dos humanos e outros vertebrados, e são de vital importância nalgumas espécies de fungos (Hari et al., 1994).

## 1.1. Definição e classificação dos pigmentos

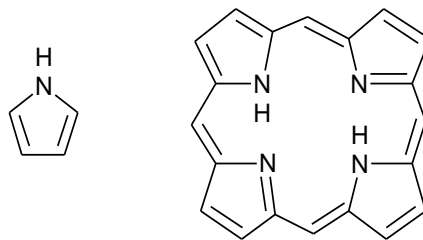
Pigmentos são compostos químicos que absorvem luz na faixa de comprimento de onda na região da luz visível. Produzem cor através do cromóforo, a estrutura específica destes compostos que captam energia e que leva à excitação dos electrões, passando de uma orbital no estado fundamental externa para outra de energia superior. A energia não absorvida é reflectida e/ou refractada, sendo captada pelo olho humano, gerando impulsos neurais e transmitida ao cérebro que a interpreta como cor (Hari et al., 1994).

Os pigmentos podem ser classificados quanto à sua origem: naturais (produzidos por organismos como plantas, animais, fungos ou microrganismos), sintéticos (obtidos via laboratorial) ou inorgânicos (encontrados na natureza ou reproduzidos por síntese) (Bauernfeind, 1981). Também pode-se classificar os pigmentos quanto à estrutura química do cromóforo: cromóforos com sistemas conjugados (ex. carotenóides, antocianinas, betalaínas, etc); e porfirinas metal-coordenadas (ex. clorofila, mioglobina, seus derivados) (Wong, 1989).

Outro tipo de classificação rege-se pelas características estruturais, sendo esta a classificação mais usada: derivados de tetrapirrólicos (clorofila e cores ferrosas), derivados de isoprenóides (carotenóides e iridóides), compostos *N*-heterocíclicos diferentes dos tetrapirrólicos (purinas, pterinas, flavinas, fenazinas, fenoxazinas, betalaínas), derivados de benzopireno (antocianinas e outros flavonóides), quinonas e melaninas (Bauernfeind, 1981).

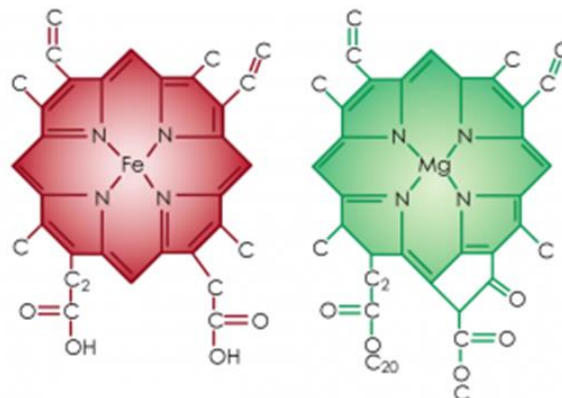
### 1.1.1. Breve descrição: Derivados de tetrapirrólicos

Estes compostos têm uma estrutura composta por anéis pirrólicos, arranjados de forma linear ou circular (Fig. 1). Com forma circular, destaca-se o grupo ferroso, em que o anel porfirina está ligado a um átomo metálico, casos da hemoglobina (Fig. 2) e mioglobina, presentes nos animais; e dos citocromos, peroxidases ou catalases, distribuídos por inúmeras espécies diferentes.



**Figura 1.** Anel pirrólico (lado esquerdo). Anel porfirina (lado direito), constituído por 4 anéis pirrólicos, ligados entre si por pontes metínicas.

A clorofila, outro derivado de tetrapirrole (Fig. 2), e o mais importante deste grupo de pigmentos; também possui arranjo circular e encontra-se presente em todas as plantas e na maioria das algas (Britton, 1991).

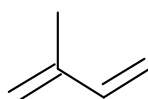


**Figura 2.** Molécula da hemoglobina humana (esquerda) e clorofila (direita); dois derivados de tetrapirrole, que são duas porfinas ligadas a iões metálicos.

### 1.1.2. Breve descrição: Derivados de isoprenóides

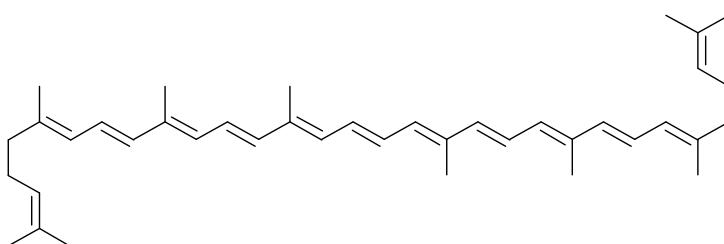
Também denominados de terpenóides, os isoprenóides (Fig. 3) são uma grande família de compostos naturais com múltiplas funções, onde se englobam hormonas, pigmentos e fitoalexinas. Devido à sua abundância e estrutura, foram criados dois subgrupos de pigmentos dentro deste grupo: carotenóides e quinonas (Rwabahizi e Wrolstad, 1988).

Os carotenóides são um dos principais pigmentos naturais, e de forma geral formam-se com oito unidades de isopreno (Goodwin, 1980).



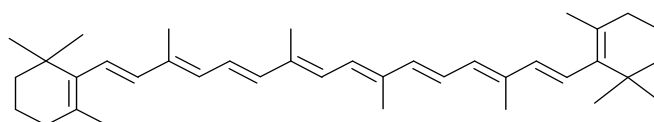
**Figura 3.** Estrutura molecular do isopreno.

Todos os carotenóides podem ser considerados derivados do licopeno (C<sub>40</sub>H<sub>56</sub>) (Fig. 4), através das seguintes reacções: hidrogenação, desidrogenação, ciclização, inserção de oxigénio, migração de dupla ligação, migração de grupos metilo e encurtamento da cadeia (Goodwin, 1980).



**Figura 4.** Estrutura molecular do licopeno.

Há os carotenos constituídos apenas por com carbono e hidrogénio (Fig. 5) e os carotenoides, constituídos por carbono, hidrogénio e oxigénio (Lichtenhaler, 1987).



**Figura 5.** Estrutura molecular do β-caroteno.

Os carotenóides são responsáveis pelas cores vermelhas, laranjas e amarelas em frutos, vegetais, fungos, flores, aves e insectos; e estão presentes em organismos fotossintéticos e não-fotossintéticos. Para além da função de coloração, os carotenóides também estão amplamente envolvidos na fotossíntese, como pigmentos acessórios na captação de luz e fotoprotectores contra danos oxidativos (Scheller et al., 1997). Há vários séculos que os

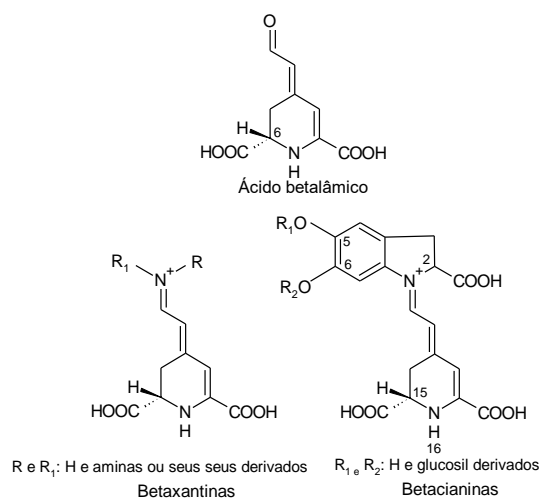
carotenóides são usados como corantes naturais, utilizando açafrão, pimento ou óleo de palma para esse fim. Para além da cor, estes alimentos fornecem ainda vitamina A e antioxidantes (Kläui, 1979).

### 1.1.3. Breve descrição: Compostos *N*-heterocíclicos diferentes dos tetrapirróis

Este grupo divide-se em seis subgrupos: purinas, pterinas, flavinas, fenazinas, fenoxazinas e betalaínas (Delgado-Vargas et al., 2000). As purinas são nucleótidos, e como tal, encontram-se presentes em dois sítios: no ácido desoxirribonucleico (ADN) e no ácido ribonucleico (RNA). Estas moléculas são essenciais para a vida e estão presentes em todos os organismos vivos (Hari et al., 1994).

As pterinas, compostas por um anel pteridino, estão provavelmente presentes em todas as formas de vida, sendo responsáveis pela coloração nalguns insectos, vertebrados, nos olhos, urina e até bactérias (Forrest, 1962). As flavinas são formadas por um anel pteridina e um anel benzeno condensado. Destaca-se deste grupo a riboflavina, sintetizada em todas as células vivas de microrganismos e plantas (Counsell et al., 1979). As fenazinas são encontradas em algumas bactérias, e as fenoxazinas nalguns fungos e insectos (Hari et al., 1994).

As betalaínas são o principal subgrupo desta classe de pigmentos, sendo derivados do ácido betalâmico (Fig. 6). Estas podem ser divididas em dois sub-grupos: as betaxantinas (amarelas) e as betacianinas (vermelhas-arroxeadas) (Böhm e Rink, 1988).



**Figura 6.** Estrutura molecular do ácido betalâmico (C<sub>9</sub>H<sub>9</sub>NO<sub>5</sub>), base de todas as betalaínas, betaxantinas e betacianinas.

#### 1.1.4. Breve descrição: Derivados de benzopireno

Neste grupo encontram-se os metabolitos secundários mais estudados, os flavonóides. Estes são compostos fenólicos com dois anéis aromáticos ligados por um anel pirano central (C3) e que se dividem em várias classes baseadas no estado de oxidação deste mesmo anel pirano e nas suas características de coloração: antocianinas, auronas, calconas, flavonóis, flavonas, flavanonas, dihidroflavonóis, leucoantocianidinas, catequinas, flavanóis e isoflavonóides (Harborne, 1993). Cada flavonóide pode ser modificado através de hidroxilação, metilação, acilação ou glicosilação, originando assim uma diversidade destes compostos. Os flavonóides são solúveis em água, e estão presentes nas plantas vasculares, e encontram-se em todas as partes da planta (Koes et al., 1994). Dentro dos flavonóides, as antocianinas são os mais importantes, produzindo cores desde o laranja a azul, em flores, frutos e até raízes (Koes et al., 1994).

#### 1.1.5. Breve descrição: Quinonas

Este grupo apresenta um enorme número diferente de compostos coloridos. A estrutura básica é constituída por uma cetona cíclica desnaturada, derivada de um composto mono ou policíclico aromático. As quinonas dividem-se pela sua estrutura em benzoquinonas, naftoquinonase, antraquinonas e miscelânea de quinonas; e estão presentes em cloroplastos de plantas e algas, bactérias, fungos, animais ou insectos. Em geral, as quinonas auferem cores entre o amarelo, vermelho e castanho; mas os seus sais mostram colorações roxas, azuis ou verdes (Thomson, 1962).

#### 1.1.6. Breve descrição: Melaninas

As melaninas são compostos poliméricos azotados, cujo monómero é um anel indol, e são responsáveis pelas cores mais escuras, preto, cinzento ou castanho; em animais, plantas ou microrganismos. São geralmente divididas em eumelaninas, faemelaninas e alomelaninas (Hari et al., 1994).

## **1.2. Antocianinas**

### 1.2.1 Introdução

De todos os pigmentos naturais, as antocianinas são aqueles que estão mais estudados e compreendidos, e os mais importantes a seguir à clorofila. Estudos têm sido feitos para perceber a sua biossíntese, as diversas classes e tipos, assim como as suas utilizações industriais. O nome provém das palavras gregas *anthos* (flor) e *kyanos* (azul escuro) (Counsell et al., 1979). Ao averiguar-se o porquê da acumulação de pigmentos vermelhos em vários tecidos vegetais, tendo estas descobertas coincidindo com a manipulação genética em plantas, foi possível chegar à conclusão dos diferentes papéis das antocianinas nas plantas (Swain e Bate-Smith, 1962).

### 1.2.2 Função das antocianinas nos diferentes órgãos vegetativos

Existem diferentes teorias para explicar a função das antocianinas nas plantas: protecção dos cloroplastos contra os efeitos adversos de luz excessiva; atenuação dos efeitos dos raios UV-B; e actividade antioxidante nas plantas. No entanto, estudos têm mostrado que estas teorias são válidas, mas variam de espécie para espécie, e daí, a sua maior ou menor relevância nos diversos processos vegetativos. É sugerido que as antocianinas têm um papel mais importante, mas de forma indirecta, como moduladores nas cadeias de reacção sinalizadora de oxigénio, envolvidas nos processos de crescimento e desenvolvimento vegetativo, respostas ao stress, e expressão genética (Gould et al., 2009).

As antocianinas são encontradas nos vacúolos de quase todos os tipos de célula, desde a epiderme, tecidos radiculares e tecidos vasculares. Ocorrem em raízes, subterrâneas ou aéreas; hipocótilos, cotilédones, caules, tubérculos, rizomas, estolhos, bolbos, folhas e gomos axilares (Gould et al., 2009).

As plantas mostram uma enorme diversidade na expressão de antocianinas. Em folhas, as antocianinas podem colorir por completo a folha, apenas uma das camadas, ou ficar restringida às margens ou pequenas pontuações. Algumas folhas tornam-se vermelhas antes da abscisão, outras quando em crescimento, ou durante toda a sua vida. Nalgumas plantas a produção de antocianinas só ocorre quando estas encontram-se doentes ou expostas a factores de stress (Gould et al., 2009).

### 1.2.2.1 Reacção das antocianinas a factores de stress

Na grande maioria das espécies vegetais, a biossíntese de antocianinas é uma resposta a um ou vários factores ambientais, como a forte exposição a radiação solar, radiação UV-B, temperaturas extremas, seca, exposição a ozono, carências em azoto ou fósforo, infecções fúngicas e/ou bacterianas, ferimentos; ou poluentes ambientais (Chalker-Scott, 1999). Devido à sua associação com tantos factores bióticos e abióticos, as antocianinas são quase sempre consideradas um sintoma ou parte de um mecanismo de resposta a estes factores (Gould et al., 2009).

### 1.2.2.2 Foto-protecção conferida pelas antocianinas

Um dos mecanismos de defesa das antocianinas mais relevantes nas plantas é a sua capacidade protectora em resposta à forte exposição solar (Wheldale, 1916). Apesar da radiação solar ser essencial para a fotossíntese, quando em excesso, esta pode danificar partes da cadeia fotossintética, como centros de reacção, proteínas acessórias, pigmentos ou electrões da cadeia de transporte (Adir et al., 2003). Tipicamente, as antocianinas absorvem mais a luz no espectro verde e amarelo, e esta sua filtração está provada que reduz os efeitos negativos da forte exposição solar, quando comparada entre folhas vermelhas com folhas verdes (Steyn et al., 2002). A protecção conferida pelas antocianinas está presente nas folhas senescentes de plantas caducas, na folhagem de plantas perenes, assim como na maioria das folhas jovens e em crescimento. Aliás, é neste tipo de folhagem imatura e em desenvolvimento, que são particularmente vulneráveis ao efeitos da radiação solar excessiva, que as antocianinas apresentam um papel mais protector, sendo mais sintetizadas nesta fase, e que leva a um declínio na sua produção quando a folha já esta completamente formada. O decréscimo da síntese de antocianinas leva a um acréscimo na produção de outros pigmentos, como os carotenóides e clorofila (Pettigrew e Vaughn, 1998). Assim, este é um dos processos em que a síntese de antocianinas é mais relevante nas plantas, a protecção no desenvolvimento dos tecidos vegetativos até à sua completa formação, e consequente maturação dos restantes mecanismos de foto-protecção.

### 1.2.2.3 Protecção contra raios UV

Para além da protecção conferida às plantas contra a radiação solar excessiva, outro papel das antocianinas, a protecção contra os raios ultravioleta (UV), é de grande importância, pois o DNA é particularmente sensível a esta radiação, sendo gravemente danificado e levando a possíveis mutações nas plantas (Hoque e Remus, 1999). A biossíntese de antocianinas e de outros flavonóides é activada aquando expostas à radiação UV, sendo que estas conseguem absorver biologicamente a radiação e atenuar os efeitos nos tecidos vegetativos (Takahashi et al., 1991). No entanto, a filtração de raios UV é um papel secundário, pois para serem mais eficientes, as antocianinas deveriam interceptar os raios antes de atingirem os cloroplastos, mas estas localizam-se principalmente nos vacúolos e/ou nas células epidérmicas (Woodall e Stewart, 1998). Daí que esta protecção é mais associada a outros tipos de flavonóides.

### 1.2.2.4 Propriedades antioxidante

Estes dois tipos de radiação, UV e solar em excesso, leva a um aumento na formação de radicais livres (Gould, 2003). A abundância destes compostos danifica membranas celulares, fosfolípidos, proteínas e ácidos nucleicos, essenciais para o funcionamento celular em plantas (Alscher et al., 1997). Para defenderem-se dos radicais livres, as plantas desenvolveram mecanismos antioxidantes em diferentes compartimentos intracelulares. Estes servem para controlar as concentrações de radicais livres, aumentar a resistência contra estes e reparar os danos causados (Halliwell e Gutteridge, 1999). Como já referido, as antocianinas apresentam capacidades antioxidantes.

Um antioxidante define-se como qualquer substância com a capacidade para atrasar ou prevenir a oxidação no substrato, quando em menor concentração que os compostos oxidantes (radicais livres maioritariamente). Certos flavonóides, onde incluem-se a grande maioria das antocianinas, apresentam quatro vezes mais capacidade antioxidante que a vitamina C e E, tendo sido demonstrados *in-vivo* que neutralizam a maioria dos radicais livres (Rice-Evans et al., 1997). Esta contribuição antioxidante das antocianinas varia consoante a espécie vegetal.

### 1.2.3 Importância na reprodução vegetativa

Além dos mecanismos de defesa das plantas atrás mencionados, as antocianinas, através da coloração conferida aos diferentes órgãos vegetativos, também auxiliam na atracção de

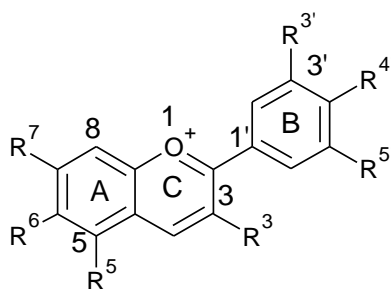
polinizadores e frugívoros, repelência de herbívoros e parasitas; e camuflagem (Konczak e Zhang, 2004). Também possuem actividades antivirais, antifúngicas e antibacterianas (Padmavati et al., 1997). As fortes e vivas colorações devidas à presença de antocianinas facilitam na reprodução vegetativa e comunicação entre planta-polinizador (Ridley, 1930).

Quanto à coloração, as antocianinas maioritariamente aparecem em tons vermelho, mas, dependente da natureza e concentração química, do pH no vacúolo, e interacções entre pigmentos; podem apresentar coloração roxa, azul, laranja, castanha e por vezes preta (Schwinn e Davies, 2004).

#### 1.2.4. Tipos de antocianinas. Biossíntese de antocianinas

No desenvolvimento floral para a maioria das angiospérmicas, as antocianinas (Fig. 7), em conjunto com outros pigmentos como carotenóides, flavonóides e betalainas; são um factor chave para a escolha de polinizadores, tornando as flores mais atractivas para estes (Gould et al., 2009).

As antocianinas, pigmentos solúveis em água, são heterósidos das antocinanidinas, que são a forma glicosada das antocianinas. A antocinanidina ou genina ou aglicona é uma estrutura de 15 carbonos, composta por dois anéis aromáticos (anel A e B) e um terceiro anel C<sub>3</sub>O<sub>1</sub> (anel C).



**Figura 7.** Estrutura molecular base de todas as antocianidinas.

O grau de oxidação do anel C define o tipo de flavonóide (Saito et al., 2003). A estrutura nuclear das antocinanidinas é modificada pela adição de um vários grupos funcionais, nomeadamente através da hidroxilação, acilação e metilação. Os tipos mais comuns de antocianidinas ocorrentes naturalmente são: pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina (Tabela 1).

A hidroxilação da antocianina é essencial para a coloração da flor, pois daí resulta o pigmento final, sem esquecer que esta pigmentação resulta sempre da interacção com a luz,

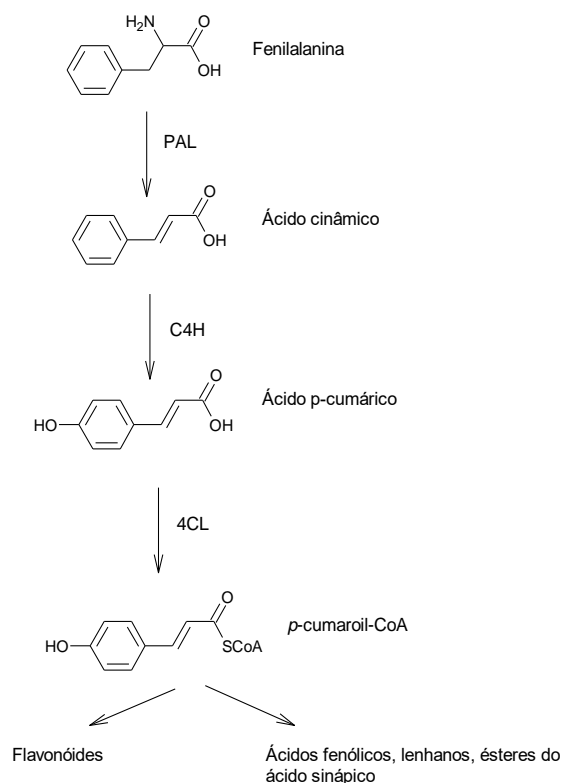
que ao passar pela epiderme celular e interagir com o pigmento, irá resultar na sua cor final (Gorton e Vogelmann, 1996).

**Tabela 1.** Antocianidinas mais comuns que ocorrem naturalmente, com a posição de substituição e a cor produzida (Gould et al., 2009)

Antocianidina	Posição de substituição							Cor produzida
	3	5	6	7	3'	4'	5'	
<b>Pelargonidina</b>	OH	OH	H	OH	H	OH	H	Laranja/Salmão
<b>Cianidina</b>	OH	OH	H	OH	OH	OH	H	Magenta/Carmim
<b>Delfinidina</b>	OH	OH	H	OH	OH	OH	OH	Roxo/Azul
<b>Peonidina</b>	OH	OH	H	OH	OMe	OH	H	Magenta
<b>Petunidina</b>	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OH	Roxo
<b>Malvidina</b>	OH	OH	H	OH	OMe	OH	OMe	Roxo

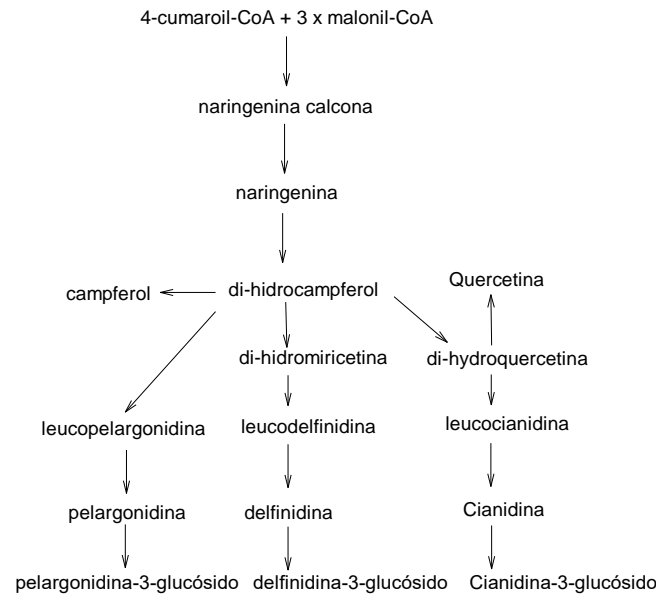
Mais de 500 antocianinas já foram descobertas e descritas, no entanto, a maioria destas têm na sua base três estruturas primárias: pelargonidina, cianidina e delfinidina (Andersen et al., 2006).

A biossíntese das antocianinas ocorre em duas fases: na primeira fase (Fig. 8), a fenilalanina é convertida em *p*-cumaroil-CoA através da acção de três enzimas: *phenylalaline ammonia-lyase* (PAL), *cinnamate-4-hydroxylase* (C<sub>4</sub>H) e *4-coumaryl-CoA ligase* (4CL). O *p*-cumaroil-CoA é o principal precursor dos flavonóides, lenhanos e outros fenilpropanóides.



**Figura 8.** Diferentes etapas da primeira fase da biossíntese de antocianinas: formação dos precursores gerais de fenilpropanóides.

Na segunda fase da biossíntese de antocianinas (Fig. 9), de entre todos os processos envolventes, destaca-se a etapa da formação da antocianina. A leucoantocianidina, através de uma oxidação e desidratação, num processo denominado antocianidina sintase (ANS); forma a antocianina colorida, à qual será adicionada a glicose, formando assim a antocianina.



**Figura 9.** Segunda fase da biossíntese de antocianinas: as etapas específicas que levam à sua formação (Adaptado de Aza-González et al., 2012).

A biossíntese de antocianinas nas flores é regulada em resposta a factores ambientais, locais e temporais. Estas são desenvolvidas, não só para a coloração da flor, mas sobretudo na abertura destas para atrair polinizadores, que coincide com a altura óptima para a sua fertilização. A luz é o principal factor abiótico regulador na síntese destes pigmentos na flor, seja de forma directa ou indirecta (Weiss, 2000).

Apesar das antocianinas fornecerem a coloração às flores, em termos ornamentais pode pretender-se a inibição na produção destes pigmentos, quer para obter flores brancas, quer para a prevalência doutros pigmentos (ex.: favorecimento de carotenóides para coloração amarela), ou para a criação de padrões coloridos nas flores. Existem dois métodos para inibir a produção de antocianinas: a inibição da produção da enzima chave na biossíntese, ou a introdução de uma outra enzima que compete pelo substrato com a enzima utilizada na síntese da antocianina (Gould et al., 2009).

### 1.2.5 Função das antocianinas nos frutos

Tal como nas flores, nos frutos, a coloração fornecida pelos pigmentos, em particular as antocianinas que originam cores entre o vermelho, azul e preto; também apresenta particular

importância na atracção de dispersores de sementes, assim como são um sinal de maturação do fruto (Wilson et al., 1990). Todos os factores de protecção mencionados anteriormente dados pelas antocianinas, também se aplicam nos frutos. Na sua maioria, os frutos, quando imaturos, apresentam uma coloração verde, e que com o seu desenvolvimento, vão adquirindo outras cores. Isto deve-se à perda de clorofila e consequente produção/acumulação de carotenóides, antocianinas e betalaínas, que vão originar a cor final do fruto, quando este encontra-se maduro e no seu estágio final. A concentração de antocianinas nos frutos varia bastante, deste as 0.25 mg/100 g (peso fresco, p.f.) até mais de 200 mg/100 g (p.f.) (Macheix et al., 1990). As antocianinas prevalecem maioritariamente na epiderme dos frutos, mas também podem ocorrer nos tecidos em redor das sementes (romã, pêsego) ou mesmo na polpa (toranja) (Gross, 1987). Existe uma forte correlação entre a luz e a síntese de antocianinas nos frutos, ou seja, em condições de ausência de luz e presença de calor, os frutos degradam as antocianinas, o que leva a uma rápida perda da coloração dos frutos; ao invés do que ocorre naturalmente, a síntese dos pigmentos que leva a uma coloração e estado óptimo de maturação do fruto (Steyn et al., 2004). Assim como a luz, a temperatura também influencia a acumulação de antocianinas. Temperaturas baixas favorecem a sua síntese, em contraste com altas temperaturas, que levam à sua degradação e perda da forte coloração (Curry, 1997). A carência em azoto também favorece a produção de antocianinas (Steyn et al., 2002).

#### 1.2.6 Possíveis utilizações das antocianinas

Devido ao largo espectro de cores provenientes das antocianinas, estas podem ser utilizadas como corantes naturais, sendo esta uma das principais utilizações comerciais/industriais. Para além da coloração dada, as antocianinas têm benefícios antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-convulsivantes e diminuem o risco de doenças cardiovasculares e cancerígenas. Actualmente, as plantas mais usadas para a extracção de antocianinas são a videira (pele da uva), couve-roxa, cenouras pretas e batata-doce (Gould et al., 2009).

A humanidade há muito que usa as antocianinas para diversos fins, desde os inícios da civilização que eram usadas para arte e decoração pessoal, como corante para doces durante os reinados dos egípcios, até ao início da revolução industrial, como corante para tecidos. Mais recentemente, estes corantes naturais têm sido usados sobretudo na área alimentar (Downham et al., 2000). A maior fonte de antocianinas para a industrial alimentar tem sido as

peles das uvas sobranes da indústria vinhateira. No entanto, a extração de antocianinas para fins comerciais e industriais tem algumas limitações, principalmente as poucas espécies disponíveis para esta mesma extração, o que leva a um pequeno leque de cores disponíveis para estas indústrias. E sendo estes pigmentos extraídos de plantas, estas culturas estão sempre sujeitas aos factores abióticos e bióticos, que podem levar ao decréscimo de produção, e daí, menor produto para extrair antocianinas (Rao e Ravishankar, 2002). Para contornar estas limitações, cada vez mais têm sido estudadas alternativas, maioritariamente as culturas de células vegetais. Estas culturas de células, apesar do seu interesse para a produção destes flavonóides, não têm até hoje um sistema de produção a grande escala que possa saciar a procura (Gould et al., 2009). Outro dos entraves na comercialização de antocianinas, é o acastanhamento do extracto destas (“*browning effect*”). Esta perda de coloração resulta, primeiro, pela oxidação das antocianinas pelas polifenol oxidases presentes no extracto; e segundo, as antocianinas oxidadas sofrem uma condensação e formam pigmentos castanhos, cor indesejada muitas das vezes pela indústria alimentar. O extracto da couve-roxa é o único que não sofre deste acastanhamento, sendo assim utilizado frequentemente misturado com outros tipos de pigmentos (Oszmianski e Lee, 1990).

Durante todo o processo de extração, armazenamento e aplicação no produto final; as antocianinas podem ser degradadas, daí a importância em conhecer todos os factores decisivos na sua melhor conservação. Um dos factores de maior importância é coexistência e o equilíbrio na solução aquosa de cinco espécies dependentes do pH: catião flavílio, base carbinol, calcona, base quinonoidal e a base quinonoidal aniónica (Mistry et al., 1991). Para além da influência do pH, a intensidade da coloração é resultante também do fenómeno de co-pigmentação, assim como da temperatura. O facto de usar-se dióxido de enxofre (SO<sub>2</sub>) na preservação de alimentos, este pode interagir negativamente com os pigmentos, levando a uma reacção e posterior perda de cor destes (Berké et al., 1998). Outros factores que podem afectar as antocianinas como corantes naturais em alimentos e/ou seus derivados são a solubilidade do produto, a sua forma física, qualidade microbiológica, exposição à luz, oxidação e a presença de metais (Markakis, 1982). A presença de açúcares induzem a um aumento de coloração, e para ajustar a cor desejada como corante, podem ser adicionadas outras antocianinas diferentes (Lewis et al., 1995). A sua aplicabilidade comercial como corante natural vai desde as bebidas gaseificadas, compotas, fruta enlatada, iogurtes, gelados, etc. A cor mais utilizada, derivada das antocianinas, nestes tipos de alimentos é o vermelho, podendo, por vezes, ser substituído por betalaínas como alternativa (Francis, 1989).

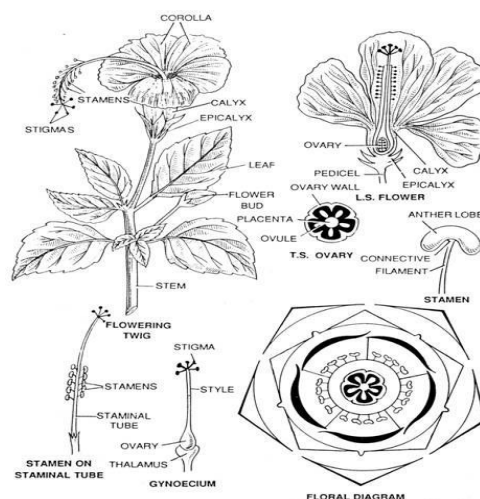
### 1.2.7 Métodos de extracção e análise

Com o grande número de estudos feitos em volta das antocianinas, também os métodos de extracção destas têm sido aperfeiçoados. Não sendo estáveis em meios neutros ou alcalinos, é necessário usar solventes acidificados na extracção de antocianinas não só para destruir as membranas celulares, como também dissolver e estabilizar os pigmentos. Normalmente o solvente usado é a água acidulada com ácido clorídrico ( $\text{HCl} < 1 \%$ ) (Harborne, 1984). Também são utilizados etanol ou metanol, acetona, ou água em ebulição (Garcia-Viguera et al., 1998). A adição de alguns ácidos orgânicos facilita o processo de extracção, assim como a água (Strack e Wray, 1989). Para fins alimentares, o mais recomendado é o etanol, devido à sua baixa toxicidade. Após a extracção, e para melhor conservação e evitar a degradação das antocianinas, o extracto deve ser armazenado em vácuo e a baixas temperaturas ( $< 30 \text{ }^\circ\text{C}$ ). O fraccionamento, separação e posterior análise dos pigmentos é realizado através de várias técnicas: cromatografia em camada delgada (CCD), cromatografia de coluna (CC), *high performance liquid chromatography* (HPLC), *high-speed counter current chromatography* (HSCCC), *high performance centrifugal partition chromatography* (HPCPC), electroforese capilar (EC) e electroforese capilar zonal (ECZ) (Gould et al., 2009). No processo de detecção dos pigmentos, a espectroscopia UV-Vis, espectrofluometria, espectrómetro de massas, ou o espectrómetro de infravermelhos; são algumas das técnicas usadas (Gould et al., 2009).

### 1.3. *Hibiscus rosa-sinensis* L.

#### 1.3.1 Introdução e classificação botânica

*Hibiscus rosa-sinensis* L. (hibisco) é uma espécie da família Malvaceae, amplamente distribuída pelas suas características ornamentais, sendo usada singularmente ou em conjunto para formação de sebes (Pekamwar et al., 2013). Originária da China, a também chamada rosa-da-china, é caracterizada pelo seu porte arbustivo, perene, com altura até 5 m e largura até 1.5 - 2 m. O sistema radicular é apurado, o caule aéreo, erecto, cilíndrico e ramificado. A folha é simples, alternada, peciolada, estipulada, margem serrada, glabra e ápice acuminado. A inflorescência (Fig. 10) é do tipo cimeira solitária e axilar. Quanto à flor, esta tem um pedúnculo articulado, com brácteas, hermafrodita, de forma larga e vistosa, pentamérica, diclamídeas, actinomorfa, completa e hipogínica. O epicálice é composto por 5 a 8 brácteolos, livres e de cor verde. O cálice possui 5 sépalas de coloração verde, e a corola também é formada por 5 pétalas, de cor variada. Quanto à estrutura sexual floral, o androceu é composto por numerosos estames, cada um deles com um único filamento e respectiva antera. O gineceu, formado por um ovário súpero, pentalocular e pentacarpelar, tem os seus carpelos unidos e com vários óvulos por lóculo. O fruto é maioritariamente estéril e abortivo (Botanical description of *Hibiscus rosa-sinensis*, 2018).



**Figura 10.** Esquema representativo de todos os órgãos vegetativos do *Hibiscus rosa-sinensis* L. (Gupta, desconhecido).

#### 1.3.2. Principais constituintes e propriedades biológicas

O hibisco tem sido objecto de inúmeros estudos e ensaios devidos às propriedades biológicas. Diferentes extractos de várias partes da planta revelaram a presença de vários

compostos: nas folhas existe a presença de alcalóides, glicosídeos, açúcares redutores, resinas, esteróis, ácidos gordos, ácido málvico; nas flores encontram-se ácido cítrico, ascórbico e oxálico, flavonóides; no caule também existe ácidos málvicos; e nas raízes, aminoácidos, taninos, proteínas e glicosídeos também são encontrados (Pekamwar et al., 2013). Os extractos das folhas são bastante utilizados na medicina tradicional como demulcente, emoliente, afrodisíaco, anticonvulsivante, hipoglicémico, regenerador capilar e preventivo para problemas cardíacos e cerebrais (Nayak et al., 2015). O seu alto teor em antocianinas nas flores aumenta mais o interesse desta planta ornamental devido às suas propriedades antioxidantes, anti-bacterianas e como corante natural (Mak et al., 2013). Por exemplo, em ensaios realizados em extractos de flores de hibisco, o teor de antocianinas foi de 153.20 µg/g p.f. (Afify e Hazem, 2016).

#### 1.4. Objectivos

Os metabolitos secundários de origem vegetal e, particularmente, os compostos fenólicos como por exemplo, as antocianinas, têm propriedades biológicas que podem ser benéficas para a prevenção ou tratamento de certas patologias. As flores de *H. rosa-sinensis* são ricas em antocianinas e em Portugal é possível encontrar indivíduos com flor cor de rosa, outros com flor vermelha e outros, ainda com cor laranja. O objectivo desta dissertação foi o de avaliar a capacidade antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, anti-acetilcolinesterase e anti-tirosinase de extractos florais dos indivíduos de *H. rosa-sinensis* de flores rosa, vermelha e laranja, bem como o efeito do tipo de solvente de extracção nas mesmas actividades biológicas determinadas *in vitro*. Um outro objectivo, não menos importante, foi o de identificar as antocianinas que dão cor diferente às flores, nos três indivíduos com flores de cor rosa, vermelha e laranja.

## 2. Metodologia

### 2.1 Preparação dos extractos florais

Para a obtenção dos extractos das flores das 3 variedades de hibisco foram realizados três extractos florais diferentes: aquoso, metanol com ácido clorídrico (0,1 %), e metanol com ácido cítrico (4 %).

Antes da preparação dos extractos, foram recolhidas aproximadamente 100 g de flores de cada variedade de hibisco. As cores escolhidas foram vermelho, rosa e laranja (Fig. 11). As amostras florais foram liofilizadas e posteriormente colocadas no exsiccador com sílica.



**Figura 11.** Três variedades de *Hibiscus rosa-sinensis* L. utilizadas no ensaio: cor rosa (esquerda), laranja (centro), e vermelha (direita).

Para a cada tipo de extracto, foram pesadas 170 mg da flor liofilizada. No extracto aquoso, adicionou-se 10 ml de água destilada, deixou-se durante 24 horas numa placa de agitação a uma temperatura de 25 °C. Procedeu-se então à centrifugação, recolheu-se o sobrenadante, e perfez-se com o mesmo solvente de extracção um volume total de 10 ml, para cada uma das variedades.

No extracto metanólico acidulado (HCl 0,1 %), às mesmas 170 mg de flor liofilizada, foi adicionado 11 ml do solvente na flor vermelha, 10,5 ml na flor laranja, e 10 ml na rosa. O procedimento posterior foi o mesmo seguido para o extracto aquoso. Quanto ao extracto metanólico acidulado com ácido cítrico (4 %), às 170 mg de flor liofilizada foram adicionadas 11,5 ml do solvente na flor vermelha, 11,5 ml na flor laranja e 12 ml na flor rosa. Os passos seguintes foram os mesmos descritos para os extractos anteriores.

No final, ficou-se com 10 ml de cada extracto para cada variedade, isto é, 9 extractos florais: extracto aquoso laranja (AquLar), aquoso rosa (AquRos), aquoso vermelho (AquVer), ácido clorídrico mais metanol laranja (HCILar), ácido clorídrico mais metanol rosa (HCIRos), ácido clorídrico vermelho (HCIVer), ácido cítrico mais metanol laranja (ACiLar), ácido cítrico mais metanol rosa (ACiRos) e ácido cítrico mais metanol vermelho (ACiVer).

## 2.2. Determinação dos fenóis totais

Para determinar a concentração total de fenóis de cada extracto seguiu-se o procedimento descrito por Mak et al. (2013). Adicionou-se 0,250 ml de extracto a 1 ml de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) e 1,250 ml de solução de Folin (numa diluição de 1:10). A amostra ficou em repouso à temperatura ambiente durante 30 minutos e leu-se a absorvância a 765 nm num espectrofotómetro. Este processo foi repetido para todos os extractos bem como para o ácido gálico que foi utilizado para a quantificação dos fenóis totais. O resultado final é expresso em g equivalente em ácido gálico (GAE)/100 g de extracto. Todos os ensaios foram efectuados em triplicado.

## 2.3. Determinação das antocianinas totais

O método utilizado para determinar o teor total de antocianinas nas diferentes amostras foi o seguido por Heinonen et al. (2016). Foram adicionados 0,05 ml de amostra com 0,5 ml de tampão cloreto de potássio pH 1, e separadamente juntou-se 0,05 ml de amostra com 0,5 ml de tampão acetato de sódio (pH 4,5). Para as duas soluções, leu-se a absorvância a 520 nm e 700 nm. O processo foi repetido para as nove amostras de extractos florais e em triplicado.

Para calcular o total de antocianinas usou-se a seguinte fórmula:

$$\text{Antocianina (cianidina-3-glucósido, g/L)} = (A \times \text{PM} \times \text{FD}) / e \times 1.$$

O valor de A (diferença de absorvâncias) foi calculado da seguinte forma:  $A = (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 1}} - (A_{520} - A_{700})_{\text{pH 4,5}}$ . PM é o peso molecular da cianidina-3-glucósido (c-3-g) (449.2 g/mol), FD o factor de diluição das amostras (10 em todas as amostras),  $e$  é o coeficiente de extinção molar da cianidina-3-glucósido (26900, em l/mol/cm) e 1 o comprimento da célula (1 cm).

O resultado final é expresso em mg de antocianina (equivalente em cianidina-3-glucósido, c-3-gE) por g de extracto massa seca.

## 2.4. Identificação das antocianinas

Os extractos metanólicos acidulados com HCl (0,1%) foram usados para a identificação das antocianinas, procedendo-se como se descreve a seguir.

O extracto metanólico foi seco e tomaram-se 2 mg do pó obtido que foram dissolvidos em 200 µL de uma solução aquosa acidulada com ácido fórmico (1.5%, v/v) e filtrado através de um filtro 0.45 µm PTFE (politetrafluoretileno).

As análises para a identificação das antocianinas foram efectuadas num LCQ Fleet Thermo Finnigan espectrómetro de massa (MS) equipado com uma fonte de ionização *electrospray* (ESI, abreviatura do inglês *electrospray ionisation*) e usando um analisador *ion trap mass*. Cada amostra foi analisada duas vezes.

O espectrómetro de massa estava acoplado a um sistema HPLC com um detector PDA (do inglês *photodiode array detector*). A coluna usada foi Zorbax Eclipse XDB C18 (Rapid Resolution, tamanho de partícula 3.5 µm, 150 mm × 4.6 mm), de fase reversa. A fase móvel usada foi: 1.5% (v/v) solução aquosa de ácido fórmico (A) e acetonitrilo (B) usando o seguinte programa de eluição: 12.5% B (0-5 min), 12.5-15.0% B (5-15 min), 15.0% B (15-20 min), 15.0-20.0% B (20-30 min), 20.0-30.0% B (30-45 min), 30.0-50.0% B (45-50 min), 50.0% B (50-60 min), 50.0-100.0% B (60-70 min) e 100.0% B (70-80 min). A fase móvel foi bombeada a uma taxa de fluxo de 0,2 ml/min. As amostras foram injectadas num volume de 10 µl. A detecção das antocianinas foi realizada entre os comprimentos de onda 200-800 nm.

## 2.5. Actividade antioxidante dos extractos florais

Utilizaram-se vários métodos de avaliação de actividade antioxidante que se descrevem a seguir. Em todos os ensaios, fizeram-se pelo menos três repetições.

### 2.5.1. Capacidade de captar os radicais ABTS

Existem diversos métodos para determinar a capacidade antioxidante de uma amostra, e no presente trabalho, um dos métodos usados foi o método ABTS (do inglês *2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)*) adaptado de Adewusi et al. (2011). Neste método o ABTS, oxidante estável, é formado através da oxidação do radical catião ABTS. O ABTS ao receber um electrão de uma amostra com capacidade antioxidante, a intensidade da cor diminui. Quanto menor a intensidade maior será actividade da amostra.

Preparou-se então uma solução ABTS 7 mM, à qual adicionou-se uma solução de persulfato de potássio ( $K_2S_2O_8$ ) 2,45 mM, tendo ficado em repouso no escuro durante 16 horas. A solução ABTS obtida foi diluída na proporção de 1:50. Para o ensaio, 0,975 ml de ABTS foram adicionados a 0,025 ml de amostra. Aguardou-se 6 minutos antes de ler a absorvância a 734 nm.

Utilizou-se a seguinte fórmula para determinar a percentagem de capacidade antioxidante ou seja, com capacidade para captar ABTS:  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ ; em que o  $A_0$  é o controlo (solução tampão no lugar da amostra) e  $A_1$  a absorvância do extracto.

O processo foi repetido para os nove extractos florais, de modo a obter o  $IC_{50}$  (do inglês *half maximal inhibitory concentration*) para cada um deles. Para amostra-referência, utilizou-se o Trolox (do inglês *6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid*), obtendo-se igualmente o seu  $IC_{50}$ .

### 2.5.2. Poder redutor

Para determinar o poder redutor das amostras foi usado o método descrito em Majdoub et al. (2017). Neste ensaio, o objectivo é determinar a capacidade dos extractos para reduzir os iões ferro, reacção esta que é corada e cuja actividade é tanto mais elevada, quanto mais intensa for a cor (Vijayalakshmi e Ruckmani, 2016).

Adicionou-se 0,050 ml de amostra com 0,5 ml de tampão fosfato (0,2 M, pH 6) e 0,5 ml de ferricianeto de potássio ( $K_3Fe(CN)_6$ ) 1 %. A amostra repousou durante 20 minutos a 50 °C, adicionando-se no final 0,5 ml de ácido tricloroacético 10 %. Agitou-se bem, e retirou-se 0,5 ml da solução, à qual juntou-se 0,5 ml de água destilada e 0,1 ml de cloreto de ferro ( $FeCl_3$ ) 0,1 %. Agitou-se e leu-se a absorvância a 700 nm.

Este protocolo foi realizado para as nove amostras e usou-se o ácido ascórbico como amostra-referência.

### 2.5.3. Actividade quelante de iões metálicos

A presença de compostos com capacidade de formar complexos com iões metálicos, impossibilita estes iões de induzirem processos oxidativos, por este motivo, compostos com esta capacidade são considerados antioxidantes. O composto ferrozina ( $C_{20}H_{13}N_4NaO_6S_2$ ) consegue formar complexo com o  $Fe^{2+}$ , formando um complexo de cor avermelhada. Quanto maior a capacidade da amostra para complexar os iões ferro, mais este fica indisponível para

reagir com a ferrozina. Assim, quanto maior a capacidade antioxidante, menor a intensidade da cor (Soler-Rivas et al., 2000).

Para determinar a actividade quelante dos extractos, adaptou-se o protocolo descrito em Majdoub et al. (2017), em que se adicionaram 0,2 ml da amostra a 0,1 ml de sulfato de ferro ( $\text{FeSO}_4$ ) 2 mM. Agitou-se bem a solução, e juntou-se 0,5 ml de ferrozina 5 mM, e de seguida leu-se a absorvância a 562 nm. A actividade quelante foi determinada usando a seguinte fórmula:  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ ; em que o  $A_0$  é o controlo (solução tampão no lugar da amostra) e  $A_1$  a absorvância do extracto. Utilizou-se o EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético,  $\text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$ ) como amostra-referência, e os resultados obtidos foram expressos em gramas de equivalente em EDTA (média de 3 repetições) por grama de extracto massa seca.

#### 2.5.4. Capacidade para captar os radicais anião superóxido

Apesar do anião superóxido ser um fraco oxidante, este produz um poderoso e perigoso radical hidroxilo e oxigénio singlete na presença de outras espécies reactivas, contribuindo para um stress oxidativo (Alam et al., 2013). A enzima superóxido dismutase (SOD) cataliza a dismutação do superóxido radical em peróxido de hidrogénio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e oxigénio molecular ( $\text{O}_2$ ), o que confere uma importante defesa contra a toxicidade do radical superóxido.

O protocolo usado no presente trabalho centra-se na conversão do *nitroblue tetrazolium* (NBT) na presença de superóxido em *diformazan*, de cor azul que será tanto mais intenso, quanto maior o teor em superóxido presente na mistura reaccional. O superóxido foi gerado através da reacção entre PMS (*phenazine methosulfate*), NADH (*Nicotinamide adenine dinucleotide* reduzido) e oxigénio (Miguel, 2010).

Adicionou-se 0,06 ml de amostra (algumas amostras tiveram de ser diluídas) com 0,06 ml de NBT 62 mM. Juntou-se 0,18 ml de NADH 98 mM e 0,06 ml de PMS (*phenazine methosulfate*) 38mM (diluído 1:5). Por fim adicionou-se 0,240 ml de tampão fosfato 19 mM pH 7,4 e leu-se a absorvância a 560 nm, fazendo a curva cinética durante dois minutos com leituras em cada 10 segundos.

Utilizou-se a fórmula  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ , em que o  $A_0$  é a absorvância do controlo (com o volume de amostra substituído por tampão) e o  $A_1$  a absorvância da amostra. O ácido ascórbico foi a substância-referência utilizada neste ensaio, e os resultados foram expressos na concentração grama de equivalente em ácido ascórbico por g de extracto massa seca (média de 3 repetições).

## 2.6. Capacidade anti-inflamatória dos extractos florais

Esta propriedade foi avaliada utilizando dois métodos que a seguir se transcreve.

### 2.6.1. Inibição da desnaturação da albumina

A inflamação faz parte do complexo biológico de tecidos vasculares a estímulos externos nocivos, como agentes patogénicos, irritações ou danos celulares. A resposta à inflamação pode ser medida através de vários métodos, na qual se determina a actividade anti-inflamatória (Jantrawut et al., 2017).

No presente trabalho, um dos métodos usados para a avaliação da capacidade anti-inflamatória dos extractos foi o da desnaturação da albumina. A albumina é uma proteína e que desnatira, isto é, perde a sua estrutura terciária e secundária na presença de temperaturas elevadas. A desnaturação das proteínas é uma causa conhecida dos processos inflamatórios (Leelaprakash e Dass, 2011). Se o extracto conseguir inibir a desnaturação da albumina poderá ser considerado possuir actividade anti-inflamatória.

No presente protocolo adicionou-se 0,250 ml de solução BSA (*bovine serum albumin*) 1% com 0,250 ml de amostra, e colocou-se durante 20 minutos a 20 °C, e posteriormente a 72 °C, durante 10 minutos. Por fim, juntou-se 1 ml de tampão fosfato sódico 66 mM pH 5,3, e leu-se a absorvância a 660 nm. Utilizou-se a fórmula  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ , em que o  $A_0$  é a absorvância do controlo (com o volume de amostra substituído por tampão) e o  $A_1$  a absorvância da amostra. Usou-se o ibuprofeno como substância-referência, e foi determinado o  $IC_{50}$  para os extractos e ibuprofeno.

### 2.6.2. Actividade inibidora de 5-lipoxigenase

A enzima 5-lipoxigenase catalisa a primeira etapa da biossíntese de leucotrienos (lípidos mediadores da inflamação, importantes em doenças cardiovasculares, cancro ou osteoporose), (Zhao et al., 2016). Amostras que consigam inibir a lipoxigenase são considerados possuírem actividade anti-inflamatória

Para determinar a actividade inibidora da 5-lipoxigenase, adaptou-se o protocolo descrito em Thitimuta et al. (2017), em que se juntara 0,01 ml de amostra com 0,05 ml de substrato (ácido linoleico 1 mM) e 0,937 ml de tampão borato (0,1 M, pH 9). Agitou-se a mistura reaccional, e após 5 minutos à temperatura ambiente, adicionou-se 0,005 ml de enzima 5-

lipoxigenase (aprox. 2700 U/ml). Voltou-se a agitar, e ao fim de 5 minutos leu-se a absorvância a 234 nm. Usou-se o ibuprofeno como substância-referência, e para determinar a actividade de inibição da enzima de cada amostra, usou-se a seguinte fórmula:  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ , em que o  $A_0$  é a absorvância do controlo (volume da amostra substituído por tampão), e o  $A_1$  a absorvância da amostra. Os resultados foram expressos em  $IC_{50}$  (mg/ml).

## 2.7. Actividade inibidora de xantina-oxidase (XO)

A enzima xantina oxidase (XO) catalisa a oxidação da hipoxantina para xantina e posteriormente para ácido úrico e peróxido de hidrogénio ( $H_2O_2$ ). A sobreprodução e/ou pouca excreção deste ácido leva à hiperuricemia, que pode causar doenças como a gota. A inibição da XO é uma das formas existentes para o tratamento destas doenças, usando substâncias como o alopurinol (El Harrad e Amine, 2016).

Neste ensaio, usou-se o protocolo adaptado de Raziq et al. (2017), em que se juntou 0.1 ml de amostra com 0,350 ml de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,5 e 0,045 ml de enzima XO (1 U/ml). A solução repousou à temperatura ambiente durante 15 minutos, e adicionou-se 0,330 ml de xantina como substrato. A solução foi deixada mais 30 minutos em repouso, à temperatura ambiente e, por fim, adicionou-se 0,1 ml de ácido clorídrico (HCl) 1 M para parar a reacção. A absorvância foi lida a 295 nm. Utilizou-se a seguinte fórmula  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$  para calcular a actividade de inibição da xantina oxidase em cada extracto floral, em que o  $A_0$  é a absorvância do controlo (com o volume de amostra substituído por tampão) e o  $A_1$  a absorvância da amostra. Usou-se o alopurinol como substância-referência, e os resultados foram expressos em g de equivalente em alopurinol por 100 g de extracto massa seca (média de três repetições).

## 2.8. Actividade inibidora de $\alpha$ -amylase

A enzima  $\alpha$ -amylase, excretada pelo pâncreas e pelas glândulas salivares, hidrolisam amido e oligossacarídeos em açúcares simples, e a inibição desta enzima pode desacelerar a digestão de hidratos de carbono, o que leva a redução do índice de absorção de glucose no sangue. Um dos métodos mais eficazes para prevenir a diabetes ou a hiperglicemia é o controlo do nível da glucose no sangue (Kalita et al, 2018).

A inibição desta enzima pode ser determinada através de diversos ensaios, tendo sido utilizado nesta dissertação o protocolo *starch-iodine color assay*, adaptado de Kalita et al.

(2018). Adicionou-se 0,050 ml de amostra a 0,1 ml de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 6,9 e 0,05 ml de enzima  $\alpha$ -amylase (0,5 mg/ml). A amostra repousou durante 10 minutos à temperatura de 37 °C e juntou-se 0,2 ml de substrato (solução de amido 1 %). Repousou mais 20 minutos à mesma temperatura e juntou-se 0,3 ml de ácido sulfúrico 10 % para parar a reacção. Por fim adicionou-se 0,3 ml de solução iodo e 8 ml de água destilada, e leu-se a absorvância a 620 nm. Para determinar a actividade de inibição da enzima  $\alpha$ -amylase, usou-se a seguinte fórmula:

$[ 1 - \{ (A^+ - A^-) - A1 \} / (A^+ - A^-) ] \times 100$ ; em que o  $A^+$  é a amostra com 0% de actividade enzimática (com tampão no lugar da enzima),  $A^-$  é a amostra com 100% de actividade enzimática (com tampão no lugar da amostra); e  $A1$  a amostra.

A acarbose foi usada como substância-referência, e os resultados foram expressos em gramas equivalentes em acarbose por g de extracto massa seca.

## 2.9. Actividade inibidora de $\alpha$ -glucosidase

Assim como a  $\alpha$ -amylase, a  $\alpha$ -glucosidase também interfere no nível da glucose no sangue, o que pode originar doenças como a diabetes. A  $\alpha$ -glucosidase é uma enzima da membrana da parede intestinal cuja função é a hidrolisar oligossacarídeos. A inibição desta enzima no tracto digestivo atrasa a digestão dos hidratos de carbono, levando a uma menor absorção de glucose após uma refeição, e consequentemente a baixos níveis de glucose no sangue. A inibição desta enzima pode ser usada como tratamento para diversas doenças, como a diabete tipo 2 (Mohammed et al., 2017).

Para determinar a inibição da enzima  $\alpha$ -glucosidase, adaptou-se o protocolo descrito em Meng et al. (2016), em que se juntou 0,050 ml de amostra a 0,060 ml de enzima ( $\alpha$ -glucosidase 0,34 U/ml) e 0,2 ml de tampão fosfato 20 mM pH 6,9. A solução repousou durante 10 minutos à temperatura de 37 °C e juntou-se 0,2 ml de substrato pNPG (*p-nitrophenyl glucopyranoside*) 0,5 mM, tendo ficado mais 35 minutos em repouso à mesma temperatura. Por fim adicionou-se 0,1 ml de carbonato de sódio 0,1 M e leu-se a absorvância a 405 nm. Para calcular a actividade de cada extracto usou-se a seguinte fórmula:  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ , em que o  $A_0$  é a absorvância controlo (com o volume em tampão no lugar da amostra) e  $A_1$  a absorvância da amostra. Usou-se a acarbose como substância-referência, e os resultados foram expressos em  $IC_{50}$  (mg/ml).

## 2.10. Actividade inibidora de acetilcolinesterase (AChE)

A diminuição da acetilcolina (ACh), o principal neurotransmissor do córtex, encontra-se associada à doença de Alzheimer. A acetilcolinesterase (AChE) é uma enzima com um importante papel na fisiopatologia da doença de Alzheimer ao hidrolisar o neurotransmissor acetilcolina (ACh), na fenda sináptica (Khadhri et al., 2017). Compostos com capacidade de inibir a acetilcolinesterase contribuem para aumentar a acetilcolina e podem ter um papel importante na doença de Alzheimer.

Para determinar a inibição da acetilcolinesterase das amostras, foi adaptado o protocolo descrito em Khadhri et al. (2017). Adicionou-se 0,04 ml de tampão Tris-HCl 0,1 M pH 8 a 0,06 ml de enzima acetilcolinesterase 0,28 U/ml e 0,025 ml de amostra e deixou-se a solução em repouso durante 15 minutos à temperatura ambiente. De seguida, adicionou-se 0,05 ml de substrato (*acetylcholine iodide*) mais 0,125 ml de DTNB (*5,5'-Dithiobis(2-nitrobenzoic acid)*), aguardou-se uma hora e leu-se a absorvância a 405 nm.

Para determinar a actividade inibitória das amostras sobre a acetilcolinesterase dos extractos florais, usou-se a seguinte fórmula:  $[(A_0 - A_1) / A_0] \times 100$ , em que o  $A_0$  é a absorvância do controlo (volume de amostra substituído por tampão), e  $A_1$  a absorvância da amostra. A galantamina foi a substância utilizada como referência.

## 2.11. Actividade inibidora de tirosinase

A tirosinase, enzima multifuncional que contém cobre na sua estrutura e amplamente distribuída na natureza, encontrando-se em frutas, vegetais ou cogumelos; tem um papel importante no acastanhamento de produtos alimentares após a colheita e/ou armazenamento de longa duração. Em mamíferos, esta enzima interfere na produção de melanina e é responsável pela sobreprodução de melanina, consequentemente o aparecimento de manchas na pele (Thitimuta et al., 2017). A inibição da tirosinase é importante para evitar as acumulações de melanina, que são prejudiciais à saúde humana e acastanhamento de produtos alimentares (Ma et al., 2017).

O protocolo usado neste ensaio foi adaptado de Majdoub et al. (2017), em que se adicionou 0,05 ml de amostra a 0,14 ml de tampão fosfato (50 mM pH 6,5) e 0,12 ml de enzima tirosinase (100 U/ml). A solução ficou em repouso durante 40 minutos à temperatura ambiente e adicionou-se 0,12 ml de substrato (*L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)*) 5 mM e aguardou-se mais 30 minutos à temperatura ambiente. Findo este período, leu-se a

absorvância a 492 nm. Para determinar a actividade inibitória dos extractos florais, usou-se a seguinte fórmula:  $[(A_0 - A_1)/A_0] \times 100$ ; em que  $A_0$  é a absorvância do controlo (volume de amostra substituída por tampão), e  $A_1$  a absorvância da amostra. Utilizou-se o ácido ascórbico como substância-referência, e os resultados dos extractos foram expressos em  $IC_{50}$  (mg/ml).

## **2.12. Análise estatística**

No presente trabalho, utilizou-se a análise de variância (ANOVA) e, quando necessário, as médias foram comparadas usando *Duncan's Multiple Range Test*, para  $p < 0.05$ . O *software* usado foi SPSS20 (SPSS Inc., Chicago, USA).

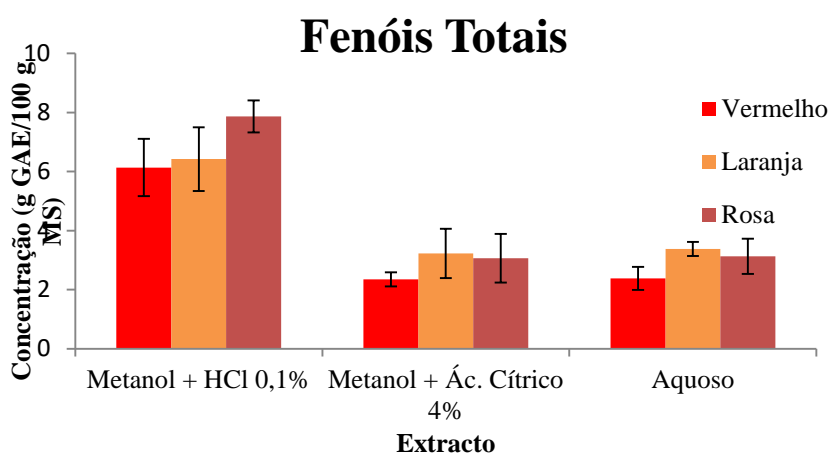
### 3. Resultados e discussão

#### 3.1 Concentração de fenóis totais e antocianinas totais nos extractos florais

Os fenóis e as antocianinas são as substâncias antioxidantes mais importantes que ocorrem nas plantas, e como tal, são óptimos indicadores de actividade antioxidante dos extractos (Sarkar et al., 2014). O método de extracção e do solvente de extracção influenciam no teor total dos fenóis e das antocianinas. Por exemplo, o acetato de etilo extrai compostos mais polares do que o metanol, etanol ou a água. Misturas hidro-alcoólicas são muito usadas para extrair produtos naturais de origem vegetal por serem menos tóxicos e, portanto, melhor aceites pelo consumidor (Waszkowiak et al., 2015).

As flores de *Hibiscus rosa-sinensis* L. são ricas em antocianinas e têm um elevado potencial terapêutico (Sarkar et al., 2014). Extractos de folhas e flores de *H. rosa-sinensis* L. em que a extracção foi feita com acetato de etilo apresentaram uma elevada concentração de fenóis e flavonóides totais, conferindo uma elevada actividade antioxidante (Afify e Hazem, 2016).

No presente trabalho, dos extractos analisados (Fig. 12 e 13), o que apresentou teores mais elevados de fenóis e antocianinas totais foi o extracto HClRos, apresentando uma concentração de fenóis totais de 7,87 g GAE/100 g massa seca e 0,91 mg c-3-gE/g MS de antocianinas totais. Ainda no teor de fenóis totais, os extractos metanólicos/HCl das flores vermelha e laranja constituíram o segundo grupo com o teor em fenóis totais mais elevados (Tabela 2), mostrando que solvente de extracção metanol/HCl foi o mais adequado para extrair os fenóis totais (Tabela 2).



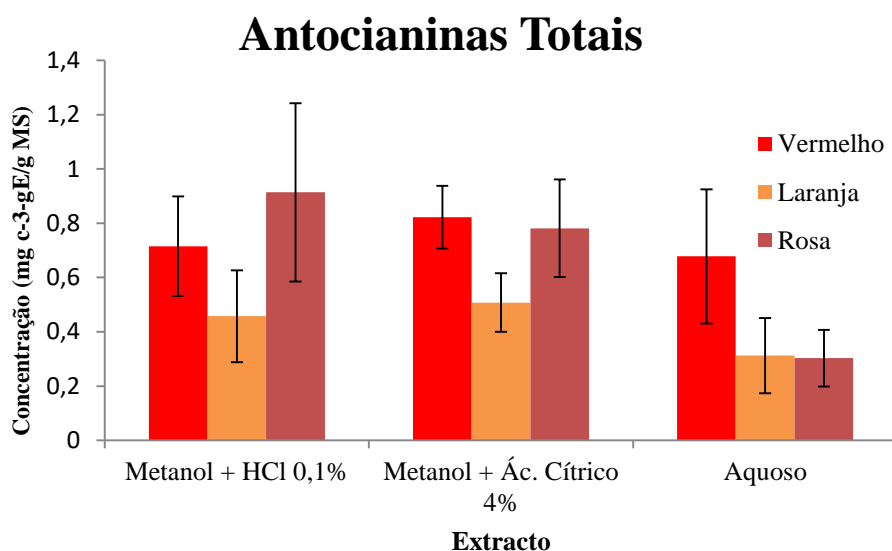
**Figura 12.** Teor de fenóis totais nos 9 extractos florais de hibisco (Barras significam desvio-padrão n = 3).

**Tabela 2.** Valores das médias obtidas (n=3) de fenóis totais (g GAE/100 g massa seca) para cada extracto e os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0.05$ ).

Extracto	Significância		
	a	b	c
ACiVer	2,345		
AquVer	2,377		
ACiRos	3,063		
AquRos	3,131		
ACiLar	3,227		
AquLar	3,380		
HCIVer		6,137	
HCI Lar		6,421	
HCI Ros			7,869

Médias que estejam na mesma coluna não são significativamente diferentes.

Quanto à concentração de antocianinas totais (Fig. 13 e Tabela 3), o extracto HCI Ros foi o que apresentou também os valores mais elevados de antocianinas totais (0,91 mg c-3-gE/g massa seca), logo seguido dos extractos ACiVer e ACiRos.



**Figura 13.** Teor de antocianinas totais nos 9 extractos florais de hibisco (Barras significam desvio-padrão n = 3).

Não existiu correlação entre o teor de antocianinas e o teor de fenóis totais ( $r = 0,259$ ,  $p < 0,05$ ).

Comparando os resultados obtidos no presente trabalho com o de outros autores (Khan et al., 2014), em que utilizaram a flor de cor vermelha extraída com metanol 80% e etanol 70%,

a concentração de fenóis totais obtidas foi aproximadamente de 0.06 g/100 g massa seca (para os dois extractos); bastante inferior aos obtidos nesta dissertação com os 3 extractos diferentes (de 2,3 a 6,1 g/100 g massa seca).

**Tabela 3.** Valores das médias obtidas (n=3) de antocianinas totais (mg c-3-gE/g massa seca) para cada extracto com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ ).

Extracto			
	a	b	c
<b>AquRos</b>	0,303		
<b>AquLar</b>	0,312		
<b>HClLar</b>	0,457	0,457	
<b>AciLar</b>	0,508	0,508	
<b>AquVer</b>		0,678	0,678
<b>HCiVer</b>		0,715	0,715
<b>ACiRos</b>			0,781
<b>ACiVer</b>			0,822
<b>HCiRos</b>			0,914

Médias que estejam na mesma coluna não são significativamente diferentes.

Num outro ensaio (Mak et al., 2013) onde também foram analisados os extractos aquoso e etanólico das flores vermelhas de *H. rosa-sinensis* L. de flor vermelha, os resultados obtidos em concentração de fenóis totais foram de 4,6 a 5,4 g GAE/100 g massa seca, mais baixo que o resultado obtido nesta dissertação no extracto metanólico/HCl; e concentração de antocianinas totais entre 1,55 a 2,06 mg c-3-gE/g MS, superiores aos resultados obtidos no presente trabalho em todos os extractos.

Na extracção das antocianinas, metanol acidulado ou etanol acidulado têm-se revelado mais eficazes do que a extracção sem a presença de um ácido ou quando o solvente de extracção é apenas a água. Ácido clorídrico, ácido cítrico ou ácido fórmico em concentrações diversas podem ser usadas, contudo, a combinação ácido clorídrico e o etanol parece ser o melhor solvente de extracção do que ácido clorídrico e metanol, ao passo que o ácido cítrico e metanol parece extrair melhor as antocianinas do que o ácido cítrico e o etanol (Vankar e Shukla, 2011). Estes autores verificaram que a mistura metanol/ácido cítrico 4% tinha sido mais eficaz a extrair as antocianinas das flores de hibisco do que a mistura metanol/HCl 0,1%. O mesmo foi verificado no presente trabalho, pelo menos para extrair as antocianinas das flores vermelha e rosa, embora para as flores rosa, a extracção com metanol/HCl 0,1% não tenha sido significativamente diferente quando comparado com o methanol/ácido cítrico 4%.

O tipo de antocianinas pode ser responsável por estes resultados. No trabalho de Vankar e Shukla (2011) não se especifica a cor das flores de hibisco utilizadas para os vários ensaios.

### 3.2. Identificação das antocianinas nos extractos florais

Nos extractos metanólicos/HCl das flores rosa foi possível identificar 6 antocianinas (Tabela 4) ao passo que nos extractos das flores vermelha e laranja apenas foram identificadas 4 antocianinas (Tabela 4), utilizando HPLC-PDA-ESI-MS em modo positivo.

**Tabela 4.** Identificação das antocianinas nos três extractos florais de hibisco usando HPLC - PDA - ESI - MS em modo positivo.

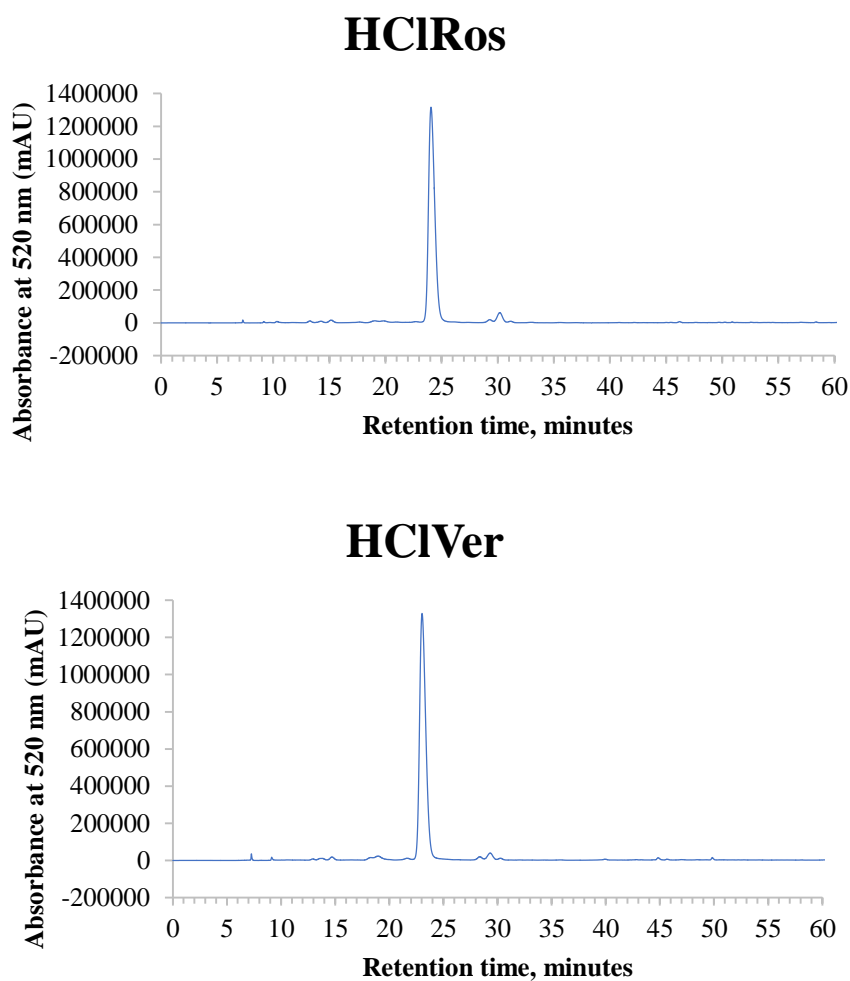
Tempo de retenção (mn)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	$[M+H]^+$ (m/z)	MS <sup>2</sup> fragment ions (m/z)	HCIRos	HCIVer	HCILar
				Identificação possível	Identificação possível	Identificação possível
24,06	247, 279, 329, 515	611	449, 287	Cianidina-3,5- <i>O</i> -diglucósido	Cianidina-3,5- <i>O</i> -diglucósido	Cianidina-3,5- <i>O</i> -diglucósido
29,29	247, 280, 322, 516	581	287	Cianidina-3- <i>O</i> -sambubiósido	Cianidina-3- <i>O</i> -sambubiósido	Cianidina-3- <i>O</i> -sambubiósido
30,19	247, 280, 514	449	287	Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido	Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido	Cianidina-3- <i>O</i> -glucósido
32,97	248, 265, 345, 515	625	303	Delfinidina 3- <i>O</i> -feruloil-ramnósido	Delfinidina 3- <i>O</i> -feruloil-ramnósido	Delfinidina 3- <i>O</i> -feruloil-ramnósido
48,01	249, 311, 526	597	303	Delfinidina-3- <i>O</i> -sambubiósido	nd	nd
48,50	249, 351, 522	713	-	Cianidina-3- <i>O</i> -(dixiloxi)glucósido	nd	nd

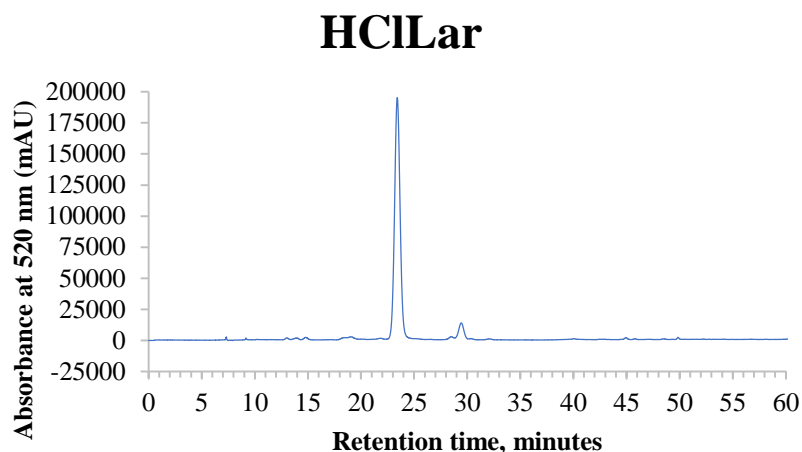
nd: não detectado

Cianidina-3-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-sambubiósido e delfinidina-3-*O*-sambubiósido foram também detectados por Maciel et al. (2018) em extractos de *H. sabdariffa*, com os iões moleculares  $m/z$  449, 581 e 597, respectivamente, tal como observado nas amostras do presente trabalho (Tabela 4). O ião fragmento  $m/z$  287 corresponde à antocianidina cianidina, ao passo que o ião fragmento  $m/z$  303 corresponde à delfinidina. Estes fragmentos foram também descritos por Maciel et al. (2018). Contudo, é importante referir que as três antocianinas cianidina-3-*O*-glucósido, cianidina-3-*O*-sambubiósido e delfinidina-3-*O*-sambubiósido só foram encontradas na amostra HCIRos, não sendo detectada a delfinidina-3-*O*-sambubiósido nos extractos das flores vermelha ou laranja (Tabela 4). Cianidina-3-*O*-glucósido foi também detectado em extractos de *H. rosa-sinensis* (Wang et al., 2000), contudo a delfinidina-3-*O*-glucósido detectado por estes autores não foi detectado nas amostras deste trabalho. Cianidina-3,5-diglucósido foi detectado em extractos de *H.*

*sabdariffa*, como um pigmento menor, com um íão molecular  $m/z$  611 e os íões fragmentos  $m/z$  449 e 287, correspondentes à cianidina glucósido e cianidina, respectivamente (Segura-Carretero et al., 2008). Delfinidina 3-*O*-feruloil-ramnósido foi detectada em todas as amostras, ao passo que cianidina-3-*O*-(dixiloxi)glucósido foi detectada apenas na amostra HCIRos (Tabela 4). Delfinidina 3-*O*-feruloil-ramnósido, com íão molecular  $m/z$  625 não foi detectada em extractos de espécies do género *Hibiscus*, apenas delfinidina-3-*O*-feruloil-glucósido ( $m/z$  641) foi detectada em extractos de *H. sabdariffa* (Amaya-Cruz et al., 2018). Cianidina-3-*O*-(dixiloxi)glucósido foi proposta estar presente numa subfracção de *H. sabdariffa* em que a separação dos pigmentos foi feita por diferença de pesos moleculares das antocianinas, Grajeda-Iglesias et al. (2016) sugeriu a presença daquela antocianina com íão molecular  $m/z$  713.

A Figura 14 representa os perfis cromatográficos dos extractos florais de: HCIRos; HCIVer; HCILar.





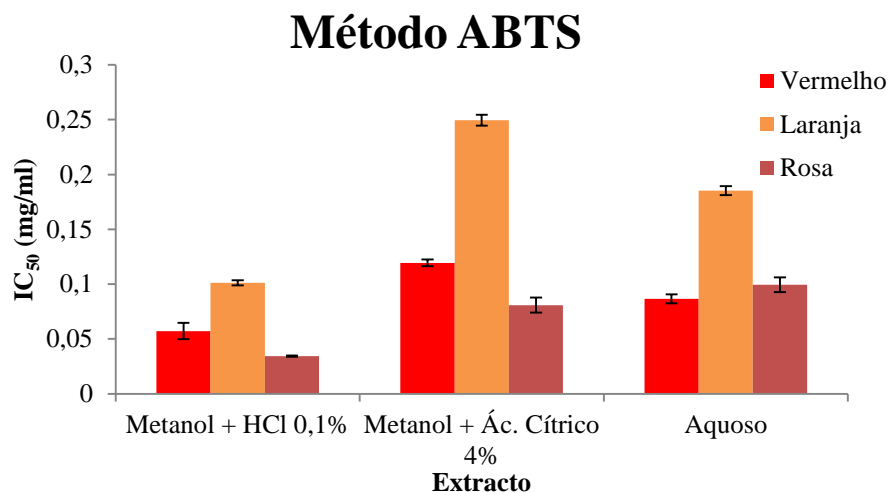
**Figura 14.** Perfil cromatográfico dos extractos florais de hibisco: HCIRos; HCIVer; HCILar.

### 3.3. Capacidade antioxidante dos extractos florais

Para analisar a capacidade antioxidante dos extractos florais analisados, foram feitos quatro ensaios para a caracterizar: ABTS, poder redutor, quelante e superóxido.

#### 3.3.1. Capacidade de captar os radicais ABTS

O método que se baseia na captação dos radicais ABTS para avaliar a capacidade anti-radicalar tem sido usado em amostras com carotenóides, fenóis e outros metabolitos, em que a descoloração dos radicais estáveis de ABTS ocorre por aceitação de um electrão da amostra (Roberta et al., 1999). Esta capacidade dos fenóis presentes em extractos de reduzir o radical catião ABTS, torna-os bons antioxidantes. O método ABTS, o ensaio do poder redutor e o método DPPH (*2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl*) são processos que se baseiam no mesmo mecanismo de transferência de electrão, isto é, num processo de oxidação-redução. Os diferentes potenciais de redução dos compostos fenólicos determinam diferentes capacidades de reduzir o ABTS, logo diferente actividade antioxidante. A extracção dos fenóis de uma amostra é dependente do tipo de extracção, bem como do tipo de solvente de extracção (Boulanouar et al., 2013).



**Figura 15.** Actividade antioxidante determinada pelo método ABTS de 9 extractos florais de hibisco, expressa em valores de IC<sub>50</sub> (mg/ml) (Barras significam desvio-padrão n = 3).

A Figura 15 representa a capacidade dos diferentes extractos para captar os radicais ABTS e através dela é possível verificar que a flor de cor rosa nos extractos metanólicos apresentam menor IC<sub>50</sub>, ou seja, têm melhor actividade antioxidante por ser preciso menor concentração do extracto para atingir 50 % de actividade, destacando-se, contudo, o extracto HClRos que tem um IC<sub>50</sub> de 0.034 mg/ml (Tabela 5). Do lado oposto, encontra-se o extracto ACiLar (IC<sub>50</sub> = 0.249 mg/ml) (Tabela 5). Neste ensaio utilizou-se o Trolox como substância referência, e o IC<sub>50</sub> encontrado para este composto foi de 0,003 mg/ml. Mesmo o extracto HClRos que apresentou a actividade mais elevada foi cerca de 10 vezes inferior à do Trolox. Todos os extractos da flor de cor laranja apresentaram os valores mais elevados de IC<sub>50</sub>, o que indica piores actividades antioxidantes (Fig. 15, Tabela 5).

**Tabela 5.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto no método ABTS (IC<sub>50</sub> (mg/ml)), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ ).

Extracto	a	b	c	d	e	f	g
HClRos	0,034						
HClVer		0,057					
ACiRos			0,081				
AquVer			0,087				
AquRos				0,099			
HClLar				0,101			
ACiVer					0,119		
AquLar						0,185	
ACiLar							0,249

Médias que estejam na mesma coluna não são significativamente diferentes.

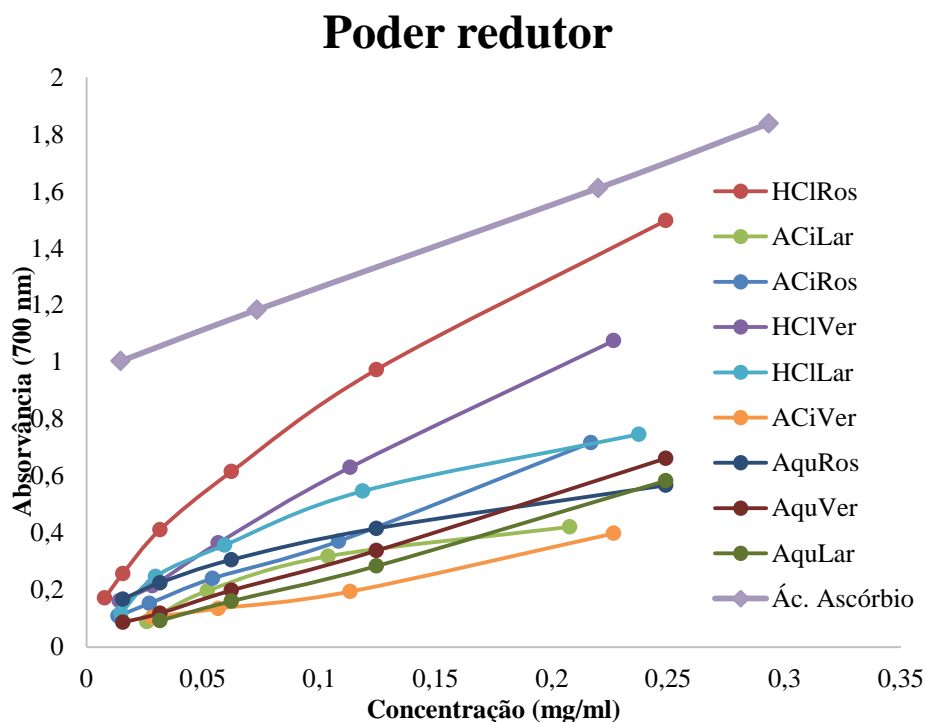
A correlação entre fenóis totais e capacidade para captar os radicais livres bem como a correlação entre as antocianinas totais e a mesma actividade foi de  $r = -0,112$  e  $r = -0,716$

( $p < 0.05$ ), respectivamente. No primeiro caso, não há qualquer correlação, ao contrário do verificado para o segundo caso, isto é, concentrações mais elevadas de antocianinas são responsáveis por maior actividade antioxidante (menor valor  $IC_{50}$ ).

Comparando com um ensaio (Wang e Li, 2011) em foi avaliada a actividade antioxidante de uma outra espécie (*Durio zibethinus* Murr.) pertencente à mesma família (Malvaceae) que *H. rosa-sinensis* L., os autores obtiveram um valor de  $IC_{50}$  de 0,0195 mg/ml, isto é, um valor bastante inferior aos  $IC_{50}$  obtidos no presente trabalho, o que mostra que esta planta apresenta melhor actividade antioxidante que os 9 extractos florais estudados. A actividade antioxidante determinada para uma outra espécie do género *Hibiscus* (*H. sabdariffa*) por Maciel et al. (2018) não pode ser comparada com os resultados apresentados neste trabalho, dado que o método e o modo de apresentação dos resultados são diferentes. Contudo, os autores verificaram que a actividade antioxidante depende do pH do extracto.

### 3.3.2 Poder redutor

O ensaio do poder redutor, um dos métodos mais comuns para determinar a capacidade antioxidante de diversos extractos, avalia a capacidade do extracto em doar um electrão a iões metálicos (Afify e Hazem, 2016). Geralmente, o poder redutor é influenciado pelo número e posição dos grupos hidroxilo ao anel aromático dos fenóis (Zhang et al., 2015). Existe uma forte correlação entre actividade antioxidante e poder redutor (Ashraf et al., 2015; Gulçin, 2005). A capacidade redutora dos nove extractos foi avaliada e os resultados estão apresentados na Fig. 16. Simultaneamente, os resultados foram comparados com o resultado de um composto referência, o ácido ascórbico ou vitamina C.



**Figura 16.** Poder redutor dos nove extractos florais e do ácido ascórbico.

Ao analisar os dados obtidos (Fig. 16), verifica-se que apenas um dos extractos (HCIRos) se aproxima bastante do poder redutor do ácido ascórbico, em que na sua concentração máxima de 0,25 mg/ml do extracto alcança uma absorvância superior a 1,4. Dos restantes extractos, apenas o HCiVer consegue ultrapassar a absorvância de 1,0. Todos os outros restantes extractos apresentam actividade de poder redutor, mas com menor relevância.

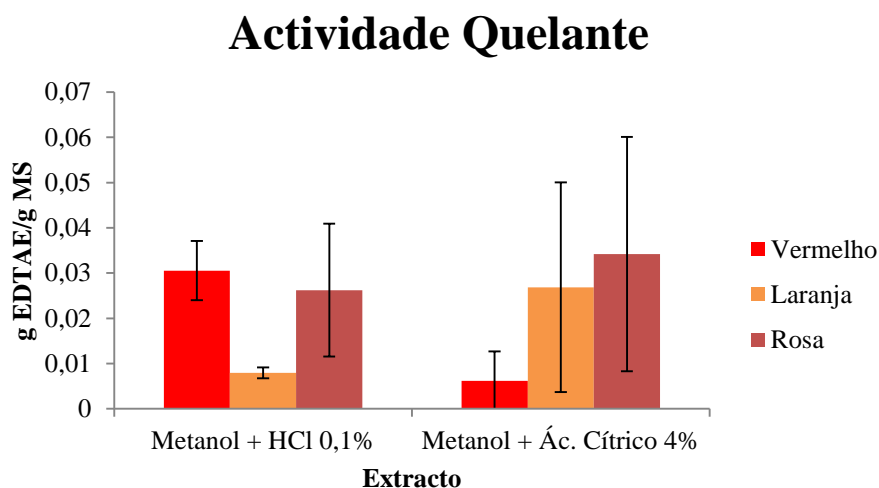
Comparando com um outro ensaio (Afify e Hazem, 2016) realizado com extracto de *H. rosa-sinensis* L. de flor vermelha, em extracto aquoso, hidro-alcolólico 80 % e etanólico 100 %; obteve-se nesta dissertação valores de absorvância bastante superiores em comparação com os daqueles autores: nesta dissertação, à máxima concentração de 0,25 mg/ml, obteve-se uma absorvância de 0,662, enquanto no ensaio (Afify e Hazem, 2016) a maior absorvância obtida foi de 0,324, mas a uma concentração do extracto de 2,0 mg/ml, sendo inclusive a maior absorvância obtida neste ensaio entre todos os diferentes extractos.

Ao comparar com um outro ensaio (Ajiboye et al., 2011) e outra espécie do mesmo género, *H. sabdariffa* L., num extracto composto por ácido fórmico, etanol e água destilada; o poder redutor obtido foi de aproximadamente 0,350 à concentração de 1 mg/ml.

Para além do teor dos compostos fenólicos, incluindo as antocianinas, o tipo o estrutura destes metabolitos é igualmente muito importante e que podem explicar a diferença de resultados obtidos por várias equipas de investigação.

### 3.3.3 Actividade quelante de iões metálicos

O ferro é considerado um poderoso pró-oxidante lipídico devido à sua relativa alta reactividade. O ião  $\text{Fe}^{2+}$  é capaz de estimular a peroxidação lipídica através da reacção de Fenton. Logo, se houver um agente que seja capaz de inactivar este ião ferroso, formando complexos estáveis, o ferro não estará disponível para induzir a oxidação lipídica (Bentes et al., 2009).



**Figura 17.** Actividade quelante de 6 extractos florais de hibisco expressa em g equivalente EDTA/g massa seca. (Barras significam desvio-padrão n = 3).

Ao analisar os dados da actividade quelante nos 9 extractos florais, verificou-se que nenhum dos extractos aquosos teve actividade quelante (Fig. 17). Para além disso, nos extractos onde foi detectada actividade verificou-se grande variabilidade dos resultados entre os replicados, por aparente interferência dos extractos com o método utilizado e que não foi possível ultrapassar. Assim, consideraram-se os valores agora apresentados. O extracto ACiRos foi o que apresentou melhor actividade quelante (0.034 g EDTAE/g masa seca), enquanto o extracto ACiVer foi o que apresentou menor actividade (0.006 g EDTAE/g massa seca), contudo, sem diferenças significativas (Tabela 6).

**Tabela 6.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto no método do poder quelante (g EDTAE/g massa seca), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ ).

Extracto	a
ACiVer	0,0062
HClLar	0,0079
HClRos	0,0262
ACiLar	0,0268
HCiVer	0,0305
ACiRos	0,0342

Médias que estejam na mesma coluna não são significativamente diferentes.

Apesar dos valores dos desvios-padrão elevados, fez-se a correlação entre os valores da actividade quelante e os valores de fenóis totais e antocianinas totais e obtiveram-se os valores 0,401 e 0,556, respectivamente. Contudo, estes dados poderão ser difíceis de discutir, dada a grande dispersão de resultados encontrados entre os replicados.

Num outro ensaio (Wong et al., 2009) comparam a actividade quelante de 5 espécies do género *Hibiscus*, incluindo *H. rosa-sinensis* L. (flor vermelha em extracto metanólico), e verificaram que esta era a que apresentava maior actividade quelante entre as espécies estudadas, com quase 60% de actividade com uma concentração de 7 mg/ml do extracto. Contudo, estes resultados não podem ser comparados com os do presente trabalho, dado que o modo de apresentar os dados são distintos e, ainda, por causa da grande variabilidade encontrada nos resultados deste trabalho.

As sementes de *H. cannabinus* L. em extracto de hexano, clorofórmio, metanol e água também apresentaram actividade quelante, com destaque para o extracto aquoso com 81,62 mg CAE (do inglês *citric acid equivalent*)/g massa seca de actividade (Yusri et al., 2012); o que indica que também é possível que outras espécies do género *Hibiscus* tenham actividade quelante, particularmente extractos aquosos, que não foi possível obter nesta dissertação com as 3 flores diferentes de *H. rosa-sinensis* L..

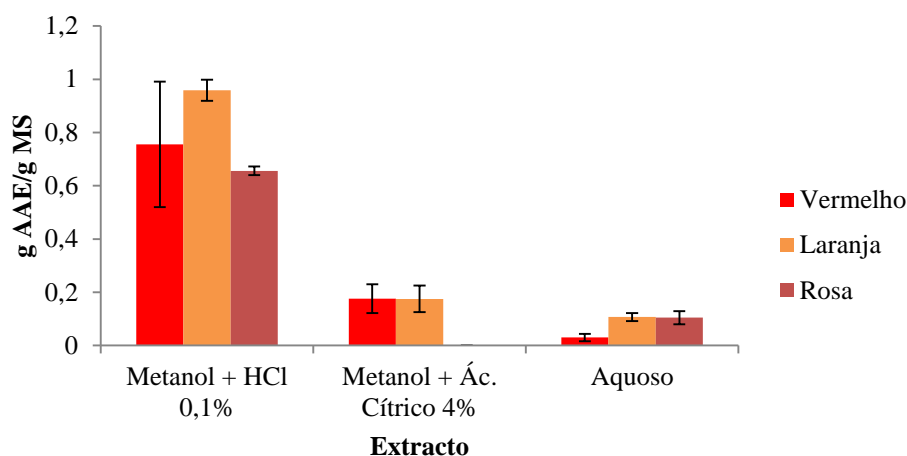
#### 3.3.4 Capacidade para captar os radicais anião superóxido

Os radical anião superóxido contribui para o aparecimento de diversas doenças e danos em tecidos, portanto, é importante existirem compostos que consigam inactivar estes radicais. Existem diversos métodos para avaliar a capacidade em captar o superóxido. Nesta dissertação usou-se o método PMS-NADH em que o superóxido gerado a partir destes 2 compostos na presença de oxigénio molecular reduz o NBT, formando-se um composto azul. Na presença de um composto capaz de captar o superóxido (antioxidante) este não está

disponível para reagir com o NBT e não se formará o composto azul ou formar-se-á menor quantidade dependente da concentração de superóxido formado na mistura reaccional (Bentes et al., 2009).

Analisando os dados obtidos no trabalho (Fig. 18) verificou-se que todos os extractos metanólicos acidulados com ácido clorídrico 0,1% apresentaram os melhores resultados para captar o radical superóxido, em que a flor de cor laranja se revelou melhor (0,96 g equivalente em ácido ascórbico/g de extracto em massa seca) comparativamente aos restantes dois extractos metanólicos/HCl 0,1% (Tabela 7). Os dois restantes solventes de extracção produziram extractos com valores baixos de actividade, inclusive a flor rosa no extracto com ácido cítrico não tem qualquer actividade de captar o radical superóxido.

### Actividade Superóxido



**Figura 18.** Capacidade de captar radical superóxido dos 8 extractos florais de hibisco, expressa em grama equivalente em ácido ascórbico/g de massa seca de extracto (Barras significam desvio-padrão  $n = 3$ ).

Correlacionando os valores da capacidade de captar superóxido com as concentrações de fenóis e antocianinas totais, obtiveram-se os seguintes valores ( $r = 0.892$  e  $r = 0.140$ , respectivamente). Existe uma correlação positiva significativa entre a concentração de fenóis e a capacidade de captar os radicais superóxido, ou seja, extractos ricos em fenóis têm uma excelente capacidade de captar superóxido, contudo, não serão as antocianinas, uma vez que o valor de  $r$  encontrada é muito baixa.

**Tabela 7.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto no método superóxido (g AAE/g massa seca), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ ).

<b>Extracto</b>	<b>a</b>	<b>b</b>	<b>c</b>
<b>AquVer</b>	0,030		
<b>AquRos</b>	0,105		
<b>AquLar</b>	0,107		
<b>ACiLar</b>	0,175		
<b>ACiVer</b>	0,176		
<b>HCIRos</b>		0,656	
<b>HCiVer</b>		0,755	
<b>HCiLar</b>			0,959

Médias que estejam na mesma coluna não são significativamente diferentes.

Quando se analisa outros ensaios que usaram extractos de *H. rosa-sinensis* L. para avaliar a actividade de captar superóxido, verificou-se que os autores (Rehana et al., 2017) também obtiveram bons resultados. duas vezes melhor até que a substância referência usada no ensaio (ácido ascórbico). Estes resultados parecem ser bons indicadores que a planta usada nesta dissertação possa ser utilizada para a extracção de substâncias com características antioxidantes, particularmente com capacidade de captar radicais superóxido.

### 3.4. Actividade anti-inflamatória

Quando as células são danificadas por danos causados por microrganismos, agentes físicos ou químicos; a ferida é a forma de resposta ao stress, e a inflamação é a resposta aos danos dos tecidos. Esta resposta defensiva é caracterizada por vermelhão, dor, calor e/ou perda de função nessa área. A desnaturação das proteínas é um processo na qual a proteína perde a sua estrutura secundária e terciária, e por consequência, a maioria das proteínas perde a sua função biológica quando desnaturadas. Esta desnaturação pode ocorrer na presença de ácidos ou bases fortes, sais inorgânicos concentrados, calor ou solventes orgânicos. Os danos causados por radicais livres e a inflamação estão relacionados, influenciando-se um ao outro, e como tal, compostos antioxidantes com capacidade para complexar radicais livres são maioritariamente bons compostos anti-inflamatórios (Dharsana et al., 2014).

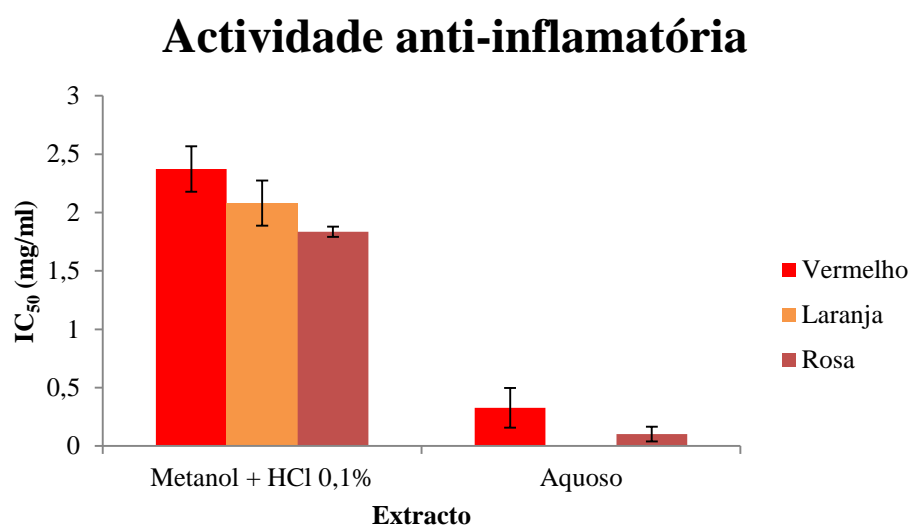
Na actividade anti-inflamatória, foram ensaiados dois métodos: o método da desnaturação das proteínas (ex: albumina) e inibição da enzima lipoxigenase.

### 3.4.1. Inibição da desnaturação da albumina

Neste método, o calor é usado para desnaturar a proteína BSA, e o objectivo é avaliar a capacidade de as amostras impedirem esta desnaturação que pode causar inflamação (Govindappa et al., 2011).

Geralmente, a concentração de fenóis numa amostra está relacionada com a actividade anti-inflamatória, ou seja, extractos com elevadas concentrações de fenóis, têm maiores actividades de inibição da desnaturação da albumina (Naz et al., 2017).

No presente trabalho, nenhum dos extractos em que estava presente ácido cítrico ou o extracto aquoso da flor laranja, logo os valores de  $IC_{50}$  só foram possíveis determinar nos restantes extractos (Fig. 19), Comparando com a substância referência (alopurinol), que apresentou um  $IC_{50}$  de 0,015 mg/ml, apenas os dois extractos aquosos das flores rosa e vermelha aproximam-se desse valor, com destaque para a flor rosa com um  $IC_{50}$  de 0,10 mg/ml, mas 15 vezes mais alto, isto é, 15 vezes menos activo que o alopurinol. Os extractos metanólicos com ácido clorídrico apresentaram actividade anti-inflamatória, mas usando concentrações muito mais elevadas (Fig. 19, Tabela 8). Pode-se concluir que a fraca actividade anti-inflamatória dos extractos com ácido clorídrico ou ácido cítrico, pode dever-se há presença deste ácidos e/ou o metanol.



**Figura 19.** Actividade anti-inflamatória dos extractos florais de hibisco avaliada através do método da inibição da desnaturação da albumina, expressa em  $IC_{50}$  (mg/ml). (Barras significam desvio-padrão  $n = 3$ ).

**Tabela 8.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto no método de avaliação de captação de radicais superóxido (IC<sub>50</sub> (mg/ml)), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ ).

Extracto	a	b	c
AquRos	0,102		
AquVer	0,327		
HCIRos		1,834	
HCILar		2,080	2,080
HCIVer			2,372

Médias que estejam na mesma coluna não são significativamente diferentes.

Os extractos aquosos das flores rosa e vermelha foram significativamente melhores em captar os radicais superóxido (Tabela 8), com os valores IC<sub>50</sub> mais baixos e, como tal, melhor actividade anti-inflamatória.

Ao correlacionar os dados obtidos neste ensaio anti-inflamatório com as concentrações de fenóis e antocianinas totais, obtiveram-se as seguintes correlações  $r = 0,908$  e  $r = 0,262$ , respectivamente. Existe uma correlação positiva significativa entre a actividade anti-inflamatória destes extractos com a sua concentração de fenóis, ou seja, quanto maior o teor de fenóis, pior a capacidade de inibir a desnaturação da proteína albumina. Praticamente não há qualquer relação entre o teor em antocianinas com a actividade anti-inflamatória, dado o valor baixo de  $r$ . Como dito anteriormente, a fraca actividade encontrada nos extractos metanólicos na presença de ácidos pode ter interferido na determinação das actividades e explicar, em parte, esta correlação inesperada entre fenóis totais e actividade inibitória das amostras na desnaturação da albumina.

Quando se analisa outra espécie da mesma família do *H. rosa-sinensis* L., as flores de *Thespesia populnea* L., os extractos da flor desta planta, extraídos com etanol e dissolvidos com DMSO, apresentam na máxima concentração uma percentagem de inibição de aproximadamente 81% (Solomon et al., 2015). Mais um indicador da capacidade anti-inflamatória das plantas desta família.

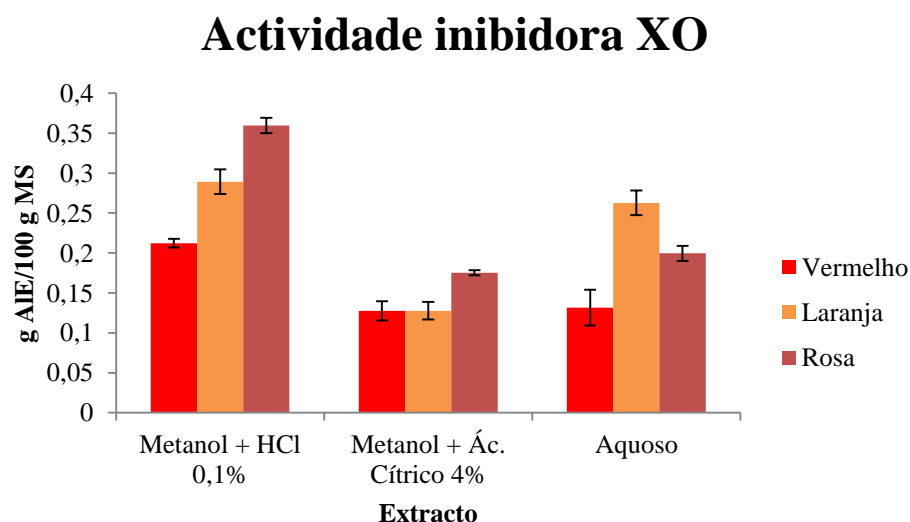
### 3.4.2. Actividade inibidora de 5-lipoxigenase

A enzima 5-lipoxigenase intervém na primeira etapa da biossíntese de leucotrienos (mediadores na inflamação e alergia) e a procura por compostos que consigam inibir total ou parcialmente a sua actividade tem aumentado significativamente nos últimos anos (Raziq et al., 2017).

Do procedimento experimental realizado para determinar a actividade inibidora da 5-lipoxigenase com os nove extractos florais de hibisco, nenhum apresentou actividade, pelo que não é possível apresentar resultados. Também não foi possível encontrar referências onde os autores tenham usado plantas do género *Hibiscus* ou da família Malvaceae, em que se tenha avaliado a inibição da enzima 5-lipoxigenase.

### 3.5. Actividade inibidora de Xantina-Oxidase (XO)

A inibição da enzima xantina oxidase, que catalisa a oxidação da hipoxantina e pode levar à incidência de hiperuricemia, é um dos processos terapêuticos no tratamento deste tipo de doenças, e torna-se essencial a descoberta de novos compostos com esta capacidade (El Harrad e Amine, 2016). O alopurinol é dos medicamentos mais usados para controlar estas patologias (Zhao et al., 2017), e foi o escolhido neste ensaio como substância-referência.



**Figura 20.** Actividade inibitória dos 9 extractos florais de hibisco na xantina oxidase (XO) expressa em g ALE/100 g massa seca. (Barras significam desvio-padrão n = 3).

Na actividade inibidora da xantina oxidase (Fig. 20), pode concluir-se que as flores nos extractos metanólicos com ácido clorídrico apresentaram maior capacidade de inibir XO

expresso em equivalente de alopurinol/100 g massa seca. destacando-se o extracto HClRos (0,36 g AIE/100 g massa seca), em contraste com os extractos metanólico/ácido cítrico e aquoso de flor vermelha, que apresentaram os valores mais baixos de inibição da enzima (Fig. 20 e Tabela 9).

**Tabela 9.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto na avaliação da capacidade inibitória das amostras na xantina oxidase (g AIE/100 g massa seca), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ )

Extracto						
	a	b	c	d	e	f
ACiVer	0,128					
AquVer	0,132					
ACiLar		0,170				
ACiRos		0,176				
AquRos			0,200			
HCiVer			0,212			
AquLar				0,263		
HCiLar					0,289	
HCiRos						0,360

Médias que estejam na mesma coluna não são significativamente diferentes.

Ao correlacionar a actividade inibidora de XO por parte dos extractos com a concentração dos fenóis e das antocianinas totais dos extractos, obtiveram-se os valores  $r = 0,859$  e  $-0,026$ , respectivamente. A correlação entre a actividade inibidora de XO e a concentração de fenóis é positiva e significativa, o que dá um bom indicar que extractos ricos em fenóis têm boa actividade para inibir a XO. Quanto às antocianinas, a correlação apresentada é praticamente zero, ou seja, o teor m antocianinas parece não ter qualquer influência na actividade encontrada.

A inibição da XO por outra espécie do género *Hibiscus* (*H. sagittifolius*) foi avaliada Duong et al. (2017) que obtiveram um valor  $IC_{50}$  (31,5  $\mu$ g/ml), sendo inclusive um dos melhores valores  $IC_{50}$  entre as 57 plantas analisadas pelos autores. A espécie *H. sabdariffa* também apresentou uma percentagem elevada de inibição, quase 100 %, o que leva a sugerir que as espécies deste género podem ser um enorme potencial como matéria-prima para extrair compostos com elevada actividade inibidora da xantina oxidase.

### 3.6. Actividade antidiabética

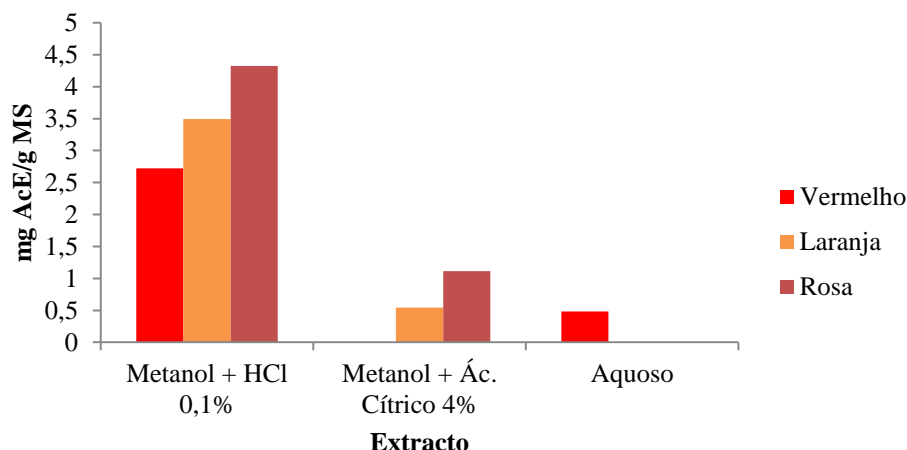
A hiperglicemia pós-refeição (*postprandial hyperglycemia*, PPHG) é uma condição na qual o nível de glucose no sangue mantém-se elevado após uma refeição, sendo um factor importante na diabetes (também denominada de diabetes mellitus) e de suas complicações derivadas, como retinopatia diabética, neuropatia diabética ou até problemas cardiovasculares. As enzimas  $\alpha$ -amylase e  $\alpha$ -glucosidase são as principais enzimas no mecanismo de produção de hidratos de carbono, incluindo monossacáridos como a glucose, que quando demasiado activas podem levar às complicações já mencionadas. Existem diversos inibidores destas enzimas, como a acarbose que foi utilizada nesta dissertação como substância-referência, mas apresentam efeitos secundários graves, principalmente no tracto gastrointestinal. Por isso têm sido feitos esforços para encontrar alternativas que não apresentem quaisquer efeitos secundários ou, pelo menos, inferiores aos provocados pela acarbose, através da extracção de compostos de origem vegetal, bactérias, fungos ou mesmo algas. No entanto, a maioria apresenta capacidade de inibição de uma das enzimas, e muito raramente consegue inibir as duas enzimas (Poovitha e Parani, 2016).

#### 3.6.1. Actividade inibidora da $\alpha$ -amilase

Na inibição da enzima  $\alpha$ -amilase (Fig. 21), verificou-se que três dos nove extractos não apresentaram actividade inibitória (flor laranja e rosa em extracto aquoso e flor vermelha em extracto metanólico/ ácido cítrico), e que os extractos metanólicos/ácido clorídrico apresentaram os melhores resultados. Destaca-se o extracto HClRos que apresentou uma actividade 4,33 mg equivalente acarbose/g massa seca, estatisticamente superior aos restantes extractos (Fig. 21 e Tabela 10).

Apesar de 6 dos extractos apresentarem actividade inibidora de  $\alpha$ -amylase, a inibição é baixa (Fig. 21), o que indica que as flores analisadas nestes extractos, apesar do teor em fenóis e antocianinas totais, não apresentam boas características para no futuro utilizar este material vegetal como inibidor desta enzima. No entanto, existe uma correlação positiva significativamente mais importante entre a actividade inibitória das amostras na  $\alpha$ -amylase e a concentração de fenóis totais ( $r = 0,961$ ), do que entre a actividade inibitória das amostras na enzima e o teor das antocianinas totais ( $r = 0,414$ ).

## Actividade inibidora $\alpha$ -amilase



**Figura 21.** Actividade inibitória dos extractos florais de hibisco na  $\alpha$ -amilase, expressa em mg AcE/g massa seca. (Barras significam desvio-padrão  $n = 3$ ).

**Tabela 10.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto na inibição da  $\alpha$ -amilase (mg AcE/g massa seca), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0.05$ ).

Extracto	Significância		
	a	b	c
AquVer	0,483		
ACiLar	0,544		
ACiRos	1,113		
HCiVer		2,721	
HCiLar		3,491	3,491
HCiRos			4,323

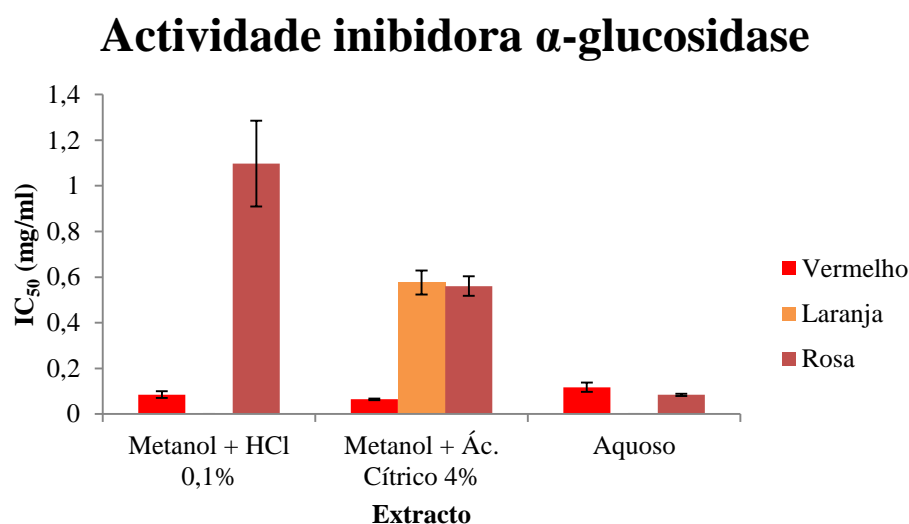
Médias que estejam na mesma coluna não são significativamente diferentes.

Nanopartículas de ZnO produzidos usando extractos de folhas de *H. rosa-sinensis* L. num outro ensaio realizado por Rehana et al. (2017) apresentaram uma capacidade relativamente boa percentagens de inibição de  $\alpha$ -amylase, ultrapassando mesmo o valor da acarbose (utilizada como substância referência). Isto mostra que apesar dos extractos florais não apresentarem uma capacidade boa para inibir a enzima, como mostrado nesta dissertação, as folhas podem ser utilizadas como alternativa para produzir nanopartículas com boa actividade inibitória (Rehana et al., 2017).

Os quiabos, frutos do *Hibiscus esculentus* L., também apresentam valores  $IC_{50}$  para a inibição de  $\alpha$ -amylase, maiores que o da acarbose (Karim et al., 2014). Os resultados mostram que a possível utilização destes frutos como inibidor da enzima não é tão boa como o da acarbose.

### 3.6.2. Actividade inibidora da $\alpha$ -glucosidase

Na inibição da  $\alpha$ -glucosidase (Fig. 22), dois dos nove extractos não apresentaram qualquer actividade inibidora (flor laranja em extracto metanólico/HCl e em extracto aquoso). Comparando com o  $IC_{50}$  da acarbose obtido (1,25 mg/ml), vê-se que todos os extractos têm um  $IC_{50}$  menor que a substância padrão, e como tal, melhor actividade para inibir esta enzima. De destacar a flor vermelha que em todos os extractos apresentou menores valores de  $IC_{50}$  (de salientar a flor vermelha em extracto metanólico/ácido cítrico que tem o menor valor  $IC_{50}$ , de 0,065 mg/ml), e para os extractos aquosos HClVer e AquRos, com valores de  $IC_{50}$  também baixos (Fig. 22 e Tabela 11).



**Figura 22.** Actividade inibitória dos 7 extractos florais de hibisco na  $\alpha$ -glucosidase expressa em  $IC_{50}$  (mg/ml). (Barras significam desvio-padrão n = 3).

Quando analisados os valores das médias obtidas (Tabela 11), verifica-se que os 3 extractos de flor vermelha e o extracto aquoso de flor rosa agrupam-se no grupo com menores valores  $IC_{50}$ , e como tal, aqueles que apresentam valores mais interessantes na inibição desta enzima. Ao correlacionar os valores obtidos nesta inibição enzimática com a concentração de fenóis e antocianinas totais, as correlações obtidas foram de  $r = 0,412$  e  $r = 0,556$ . As duas correlações são positivas, o que parece indicar que os fenóis e as antocianinas têm um efeito negativo na actividade, o que pode querer significar que outros constituintes que não os fenóis são determinantes na actividade encontrada, mas que não foram identificados no presente trabalho.

**Tabela 11.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto na inibição da  $\alpha$ -glucosidase (IC<sub>50</sub> (mg/ml)), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ ).

Extracto	a	b	c
ACiVer	0,065		
AquRos	0,084		
HCIVer	0,085		
AquVer	0,117		
ACiRos		0,561	
ACiLar		0,576	
HCIRos			1,097

Médias que estejam na mesma coluna não são significativamente diferentes.

Num outro ensaio em que os autores produziram nanopartículas de ZnO utilizando extractos aquosos de folhas de *H. rosa-sinensis* L., as nanopartículas apresentavam a melhor percentagem de inibição da  $\alpha$ -glucosidase de entre as plantas estudadas, ultrapassando inclusive a acarbose (Rehana et al., 2017). Num outro ensaio, Rasheed et al. (2018) usaram extractos de flores duma variedade do género *Hibiscus* (*H. sabdariffa* L.) obtidos usando diferentes métodos de extracção (decocção, infusão e maceração), e todos os extractos apresentaram IC<sub>50</sub> inferiores aos da acarbose, mostrando que o género *Hibiscus* pode ser um enorme potencial para a obtenção de compostos ou de extractos com capacidade de inibição da  $\alpha$ -glucosidase (Rasheed et al., 2018).

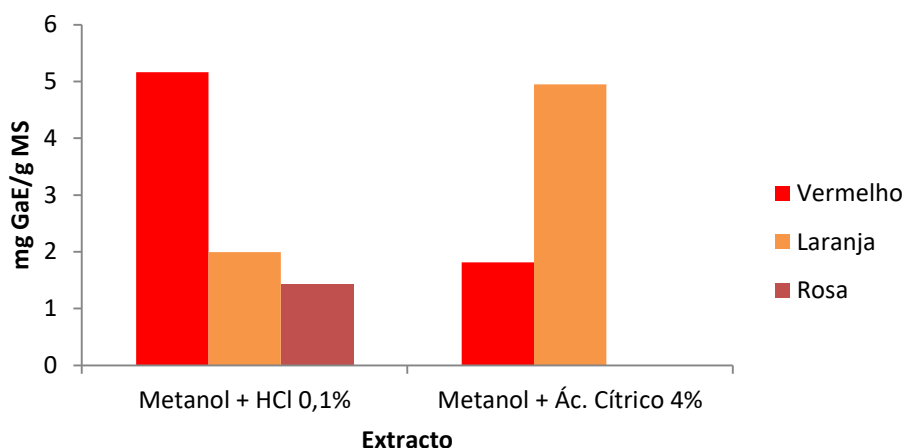
### 3.7. Actividade inibidora de acetilcolinesterase

Um dos mecanismos da doença do Alzheimer envolve a redução na produção do neurotransmissor acetilcolina o que implica uma gradual perda de memória e capacidade de aprendizagem, tendo sido descoberto que algumas moléculas inibem a degradação da acetilcolina através da inibição da acetilcolinesterase (Lima et al., 2017). É essencial estudar alternativas no combate a esta doença (compostos que possam ser usados alternadamente ou em conjunto com outros, pois os medicamentos já descobertos causam efeitos secundários indesejáveis, tolerância ou perda de eficiência (Osama et al., 2017). Moléculas como os flavonóides apresentam actividade inibidora da acetilcolinesterase (Cao et al., 2015; Sousa et al., 2017), assim como outros metabolitos extraídos de fungos (Lima et al., 2017).

Ao analisar os dados obtidos referentes à inibição da enzima AChE por parte dos extractos florais de hibisco (Fig. 23) verificou-se que quatro dos nove extractos não apresentaram

qualquer actividade (todos os extractos aquosos e o extracto ACiRos). Destacam-se os extractos HCiVer e ACiLar os que apresentaram melhor actividade: 5,32 mg e 4,95 mg equivalente galantamina (GaE)/g massa seca, respectivamente, embora sem significado estatístico (Tabela 12). A determinação da actividade inibitória dos extractos florais sobre a acetilcolinesterase foi bastante difícil, o que pode explicar, em parte, a grande variabilidade detectada nos resultados dos replicados (Tabela 12). Talvez por esta razão não tenham sido encontrados ensaios em que tenham usado órgãos vegetativos de alguma espécie do género *Hibiscus* para avaliar a sua capacidade de inibir a actividade da enzima, mas plantas da mesma família, Malvaceae, apresentam alguns resultados promissores. Por exemplo, extractos apolares (*n*-hexano) da espécie *Sida rhombifolia* L., arbusto pertencente a esta família, apresentaram inibição enzimática de 58% na concentração de 100 µg/ml (Mah et al., 2017).

### Actividade inibidora AChE



**Figura 23.** Actividade inibitória dos 5 extractos florais de hibisco na acetilcolinesterase expressa em mg galantamina equivalente/g massa seca. (Barras significam desvio-padrão n = 3).

Não houve correlação significativa entre a concentração de fenóis totais ou concentração de antocianinas totais e a actividade inibitória ( $r = 0,335$  e  $r = 0,149$ , respectivamente).

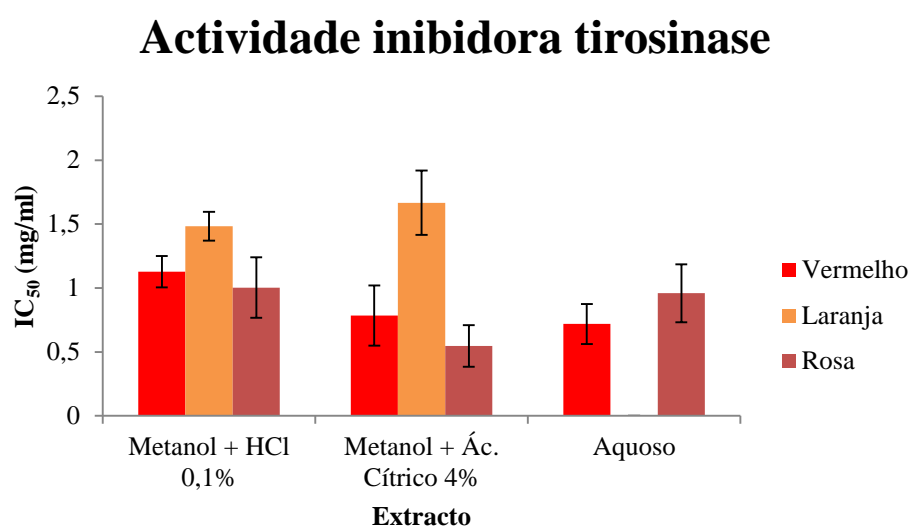
**Tabela 12.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto na inibição da acetilcolinesterase (mg GaE/g massa seca), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ ).

Extracto	a
HCiRos	1,434
ACiVer	1,816
HCiLar	1,995
ACiLar	4,950
HCiVer	5,163

Médias que estejam na mesma coluna não são significativamente diferentes.

### 3.8. Actividade inibidora de tirosinase

A tirosinase, enzima multifuncional, tem um desempenho crítico na produção do pigmento melanina, regulando-a. Esta encontra-se nos melanócitos (células da epiderme). A enzima também tem funções nas reacções de acastanhamento em alguns alimentos, o que leva a um decréscimo do seu valor nutricional. Por esta razão, a inibição desta enzima pode ser importante (Xie et al., 2018). A tirosinase é também uma enzima chave no processo de mudança de exosqueleto de insectos, portanto a sua inibição pode ser usado como insecticida (Muddathir et al., 2017).



**Figura 24.** Actividade inibitória dos extractos florais de hibisco na tirosinase expressa em  $IC_{50}$  (mg/ml). (Barras significam desvio-padrão  $n = 3$ ).

Nos nove extractos florais analisados quanto à sua capacidade inibidora da tirosinase (Fig. 24), apenas um não tem qualquer actividade (AquLar). O extracto ACiRos foi o que apresentou melhor capacidade de inibir a tirosinase ( $IC_{50} = 0,54$  mg/ml). Do lado oposto, encontraram-se dois extractos (HCiLar e ACiLar) com os valores mais altos de  $IC_{50}$  (1.48 e 1.67 mg/ml, respectivamente) (Tabela 13).

Não se encontrou qualquer correlação entre as concentrações dos fenóis totais e das antocianinas totais e a actividade inibidora das amostras na tirosinase, pelo que outros componentes presentes nos extractos possam estar envolvidos na actividade encontrada dos extractos.

Analisando outros ensaios relativos à inibição da enzima tirosinase, em que foram usadas flores de *H. sabdariffa* L., obtiveram baixas actividades inibitórias das amostras na tirosinase

(21%) na concentração de 500 µg/ml (Muddahthir et al., 2017), o que indica que os extractos florais do presente trabalho apresentam actividades melhores do que flores de *H. sabdariffa*.

**Tabela 13.** Valores das médias obtidas das 3 repetições para cada extracto na inibição da tirosinase (IC<sub>50</sub> (mg/ml)), com os respectivos grupos de significância (teste de Duncan) ( $p < 0,05$ ).

Extracto				
	a	b	c	d
<b>ACiRos</b>	0,546			
<b>AquVer</b>	0,719	0,719		
<b>ACiVer</b>	0,785	0,785	0,785	
<b>AquRos</b>		0,959	0,959	
<b>HCIRos</b>		1,003	1,003	
<b>HCiVer</b>			1,127	
<b>HCiLar</b>				1,484
<b>ACiLar</b>				1,667

Médias que estejam na mesma coluna não são significativamente diferentes.

## 4. Conclusão

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho foi possível concluir que o solvente de extracção foi importante para a extracção dos metabolitos secundários fenóis, revelando-se que o solvente constituído por metanol acidulado com HCl 0,1% foi o mais adequado. No que diz respeito à extracção das antocianinas, o solvente menos adequado foi a água para extrair os pigmentos das flores rosa e laranja. A flor rosa continha mais antocianinas do que as flores laranja e vermelha. As antocianinas encontradas na flor rosa foram cianidina-3,5-*O*-diglucósido, cianidin-3-*O*-sambubiósido, cianidina-3-*O*-glucósido, delphinidina-3-*O*-(feruloil)ramnósido, delphinidina-3-*O*-sambubiósido, cianidina-3-*O*-(dixiloxi)glucósido. Nas restantes duas variedades, estas duas últimas antocianinas não foram detectadas.

As actividades biológicas estudadas dependeram não só da variedade, isto é, da cor da flor de hibisco, como também do tipo de solvente usado. Assim, a variedade com a flor rosa e o solvente constituído por metanol/HCl 0,1% foram os que apresentaram melhores actividades anti-radicalar, poder redutor, capacidade de inibir as enzimas xantina oxidase e  $\alpha$ -amilase. O solvente metanol/HCl revelou-se também o mais adequado para extrair os componentes responsáveis pela captação dos radicais superóxido, independentemente da cor da flor de hibisco, embora a flor laranja tenha sido a que apresentou melhor actividade neste grupo. O extracto feito a partir da flor rosa, mas usando o solvente metanol/ácido cítrico foi o melhor para inibir a enzima tirosinase, contudo, e usando o mesmo solvente, foi a flor vermelha que apresentou a melhor capacidade para inibir a actividade da  $\alpha$ -glucosidase. Já na inibição da desnaturação da albumina foi o extracto aquoso o que se revelou mais adequado.

## 5. Perspectivas futuras

São muitas as possibilidades de investigação sobre o hibisco, contudo, são sugeridas pelo menos quatro linhas de investigação que poderão ser desenvolvidas em trabalhos futuros:

1. Encontrar os mecanismos envolvidos na origem das diversas cores (rosa, vermelho e laranja) das flores de hibisco bem como determinar quais os factores bióticos e abióticos que poderão desencadear o aparecimento dessas cores.

2. A determinação da composição em antocianinas das flores permitiu concluir que existe um perfil diferente consoante a cor. Assim, é importante avaliar que outros metabolitos podem ser encontrados não só nas flores mas também noutras partes da planta consoante a cor da flor. Também aqui poder-se-á avaliar quais os factores bióticos e abióticos que desencadeiam o aparecimento de uns metabolitos em detrimento de outros.

3. As diversas actividades (antioxidante, anti-inflamatória, antidiabética, entre outras) determinadas *in vitro* no presente trabalho têm de ser confirmadas em modelos *in vivo*, em que os processos de biotransformação, absorção e excreção podem e têm de ser avaliados. Os metabolitos encontrados na planta com potencial actividade podem desaparecer por completo após um processo de biotransformação hepático ou intestinal, através da sua microbiota natural.

4. No caso da biotransformação ocorrer, probabilidade muito elevada, processos de encapsulamento de flores, pigmentos ou outras partes da hibisco terão de ser desenvolvidas a fim de ter um produto final que não perde a actividade após a ingestão, dado que os compostos activos estão envoltos por uma “cápsula” que os protege. Esta área de investigação e desenvolvimento teria de encontrar sistemas que fossem estáveis e em diferentes matrizes para que pudessem ser usados em diferentes tipos de alimentos.

## 6. Referências bibliográficas

- Adewusi, E.A., Steenkamp, V.. 2011. *In vitro* screening for acetylcholinesterase inhibition and antioxidant activity of medicinal plants from Southern Africa. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 4(10): 829–835.
- Adir, N., Zer, H., Scholat, S., Ohad, I. 2003. Photoinhibition – a historical perspective. *Photosynthesis Research*, 76, 343–370.
- Afify, A.M.M.R., Hazem, M.M.H.. 2016. Free radical scavenging activity of three different flowers-*Hibiscus rosa-sinensis*, *Quisqualis indica* and *Senna surattensis*. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(9): 771–777.
- Ajiboye, T.O., Salawu, N.A., Yakubu, M.T., Oladiji, A.T., Akanji, M.A., Okogun, J.I. 2011. Antioxidant and drug detoxification potentials of *Hibiscus sabdariffa* anthocyanin extract. *Drug and Chemical Toxicology*, 34(2): 109–115.
- Alam, M.N., Bristi, NJ, Rafiquzzaman, M.. 2013. Review on *in vivo* and *in vitro* methods evaluation of antioxidant activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21(2): 143–152.
- Alscher, R.G., Donahue, J.L., Cramer, C.L. 1997. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells. *Physiologia Plantarum*, 100: 224–233.
- Amaya-Cruz, D.M., Perez-Ramirez, I.F., Ortega-Diaz, D., Rodriguez-Garcia, M.E., Reynoso-Camacho, R.. 2018. Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) by-product as functional ingredient: effect of thermal processing and particle size reduction on bioactive constituents and functional, morphological, and structural properties. *Food Measure*, 12: 135-144.
- Andersen, Ø.M., Jordheim, M.. 2006. The anthocyanins. In: Anderson, Ø.M. e Markham, K.R. (Eds.), *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*. CRC Press, Boca Raton, pp. 471–553.
- Ashraf, A., Sarfraz, R.A., Rashid, M.A., Shahid, M.. 2015. Antioxidant, antimicrobial, antitumor, and cytotoxic activities of an important medicinal plant (*Euphorbia royleana*) from Pakistan. *Journal of Food and Drug Analysis*, 23(1): 109-115.
- Bauernfeind, J. C.. 1981. Natural food colors. In: Bauernfeind, J. C., Ed., *Carotenoids as Colorants and Vitamin A Precursors*, Academic Press, New York, 1981, 1-45.
- Bentes, J., Miguel, M.G., Monteiro, I., Costa, M., Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G.. 2009. Antioxidant activities of the essential oils and extracts of Portuguese *Thymbra capitata* and *Thymus mastichina*. *Italian Journal of Food Science*, 21(2): 183–195.
- Berké, B., Chèze, C., Vercauteren J., Deffieux, G., 1998. Bisulfite addition to anthocyanins: Revisited structures of colourless adducts. *Tetrahedron Letters*, 39: 5771–5774.
- Böhm, H. and Rink, E., Betalains. 1988. In: *Cell culture and somatic cell genetics of plants*. Academic Press, New York, 449–463.
- Botanical description of *Hibiscus rosa-sinensis* - [http://www.readorrefer.in/article/Botanical-description-of-Hibiscus-rosa-sinensis\\_1003/](http://www.readorrefer.in/article/Botanical-description-of-Hibiscus-rosa-sinensis_1003/) (acedido a 05/03/2018).
- Boulanour, B., Abdelaziz, G., Aazza, S., Gago, C., Miguel, M.G.. 2013. Antioxidant

activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. *Industrial Crops and Products*, 46: 85–96.

Britton, G.. 1991. Carotenoids, Method. Plant Biochemistry, 7: 473–518.

Cao, J., Zheng, Y., Xia, X., Wang, Q., Xiao, J.. 2015. Total flavonoid contents, antioxidant potential and acetylcholinesterase inhibition activity of the extracts from 15 ferns in China. *Industrial Crops and Products*, 75: 135–140.

Chalker-Scott, L.. 1999. Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses. *Photochemistry and Photobiology*, 70: 1–9.

Counsell, J.N., Jeffries, G.S., Knewstubb, C.J.. 1979. Some other natural colors and their applications. In: Counsell, J. N. and Dunastable, J. A., Eds., Natural Colors for Foods and Other Uses. Applied Science, London, 122–151.

Curry, E.A.. 1997. Temperatures for optimal anthocyanin accumulation in apple tissue. *Journal of Horticultural Science*, 72: 723–729.

Delgado-Vargas, F., Jimenez, A.R., Paredes-Lopez, O.. 2000. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 40: 173–289.

Dharsana, J.N., Mathew, S.M.. 2014. Preliminary screening of anti-inflammatory and antioxidant activity of *Morinda umbellata*. *International Journal of Pharmacy and Life Sciences*, 5(8): 3774–3779.

Downham, A., Collins, P.. 2000. Colouring our foods in the last and next millennium. *International Journal of Food Science And Technology*, 35: 5–22.

Duong, N.T., Vinh, P.D., Thuong, P.T., Hoai, N.T., Thanh, L.N., Bach, T.T., Anh, N.H., Anh, N.H.. 2017. Xanthine oxidase inhibitors from *Archidendron clypearia* (Jack.) I.C. Nielsen: Results from systematic screening of Vietnamese medicinal plants. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 10(6): 549–556.

El Harrad, L., Amine, A.. 2016. Amperometric biosensor based on Prussian blue and nafion modified screen-printed electrode for screening of potential xanthine oxidase inhibitors from medicinal plants. *Enzyme and Microbial Technology*, 85: 57–63.

Elliott, C.D.. 1983. The pathway of betalain biosynthesis: effect of cytokinin on enzymic oxidation and hydroxylation of tyrosine in *Amaranthus tricolor* seedlings. *Physiologia Plantarum*, 59: 428–437.

Frick, D., Meggos, H.. 1988. FD&C colors, Food Technol., 7: 49–56.

Forrest, H. S.. 1962. Pteridines: structure and metabolism. In: Florkin, M. and Mason, H. S., Eds, Comparative Biochemistry. A Comprehensive Treatise. Vol. IV. Constituents of Life-Part B. Academic Press, New York, 615–641.

Francis, F.J.. 1989. Food colourants: Anthocyanins. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 28: 273–314.

Garcia-Viguera, C., Zafrilla, P., Tomas-Barberan, F.A.. 1998. The use of acetone as an extraction solvent for anthocyanins from strawberry fruit. *Phytochemical Analysis*, 9: 274–

Goodwin, T.W.. 1980. Biochemistry of the Carotenoids. Vol. 1: Plants., 2nd. ed., Chapman and Hall, New York, 1–95.

Gorton, H., Vogelmann, T.C.. 1996. Effects of epidermal cell shape and pigmentation on optical properties of Antirrhinum petals at visible and ultraviolet wavelengths. *Plant Physiology*, 112: 879–888.

Gould, K.S.. 2003. Free radicals, oxidative stress and antioxidants. In: Thomas, B., Murphy, D.J. and Murray, B.G. (Eds), *Encyclopedia of Applied Plant Sciences*. Elsevier, Amsterdam, pp. 9–16.

Gould, K., Davies, K., Winefield, C.. 2009. Anthocyanins, Biosynthesis, Functions and Applications. New York. Springer. 5-315.

Govindappa, M., Channabasava, R., Sowmya, D.V., Meenakshi, J., Shreevidya, M.R., Lavanya, A., Gustavo, S., Sadananda, T.S.. 2011. Phytochemical screening, antimicrobial and *in vitro* anti-inflammatory activity of endophytic extracts from *Loranthus* sp.. *Pharmacognosy Journal*: 3(25): 82–90.

Grajeda-Iglesias, C., Figueroa-Espinoza, M.C., Barouh, N., Baréa, B., Fernandes, A., de Freitas, V., Salas, E.. 2016. Isolation and characterization of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* flowers. *Journal of Natural Products*, 79: 1709-1718.

Gross, J.. 1987. Pigments in Fruits. Academic Press, London.

Gulçin, I.. 2005. The antioxidant and radical scavenging activities of black pepper (*Piper nigrum*) seeds. *International Journal of Food Science and Nutrition*, 56: 491–499.

Gupta, H. (desconhecido) An overview on malvales; Family- Malvaceae | Botany - <http://www.biologydiscussion.com/plants/flowering-plants/an-overview-on-malvales-family-malvaceae-botany/19510> (acedido a 05/03/2018).

Halliwell, B., Gutteridge, J.M.C.. 1999. Free Radicals in Biology and Medicine. Oxford University Press, Oxford.

Harborne, J.B.. 1984. Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis, 2nd Ed. Chapman & Hall, London.

Harborne, J.B.. 1993. New naturally occurring plant polyphenols. In: Scalbert, A., Ed. *Polyphenolic Phenomena*, Paris, 9–21.

Hari, R.K., Patel, T.R., Martin, A.M.. 1994. An overview of pigment production in biological systems: functions, biosynthesis, and applications in food industry. *Food Reviews International*, 10(1): 49–70.

Heinonen, J., Farahmandazad, H., Vuorinen, A., Kallio, H., Yang, B., Sainio, T.. 2016. Extraction and purification of anthocyanins from purple-fleshed potato. *Food and Bioproducts Processing*, 99: 136–46.

Hoque, E. and Remus, G.. 1999. Natural UV-screening mechanisms of Norway spruce (*Picea abies* [L.] Karst.) needles. *Photochemistry and Photobiology*, 69: 177–192.

Jantrawut, P., Phongpradist, P., Muller, M., Viernstein, H.. 2017. Enhancement of anti-

inflammatory activity of polyphenolic flavonoid rutin by encapsulation. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30: 1521–28.

Kalita, D., Holm, D.G., LaBarbera, D.V., Petrash, J.M., Jayanty, S.S.. 2018. Inhibition of  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase, and aldose reductase by potato polyphenolic compounds. *PLoS ONE* 13(1): e0191025. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0191025>.

Karim, M.R., Islam, M.S., Sarkar, S.M., Murugan, A.C., Makky, E.A., Rashid, S.S., Yusoff, M.M.. 2014. Anti-amylolytic activity of fresh and cooked okra (*Hibiscus esculentus* L.) pod extract. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 3(4): 373–377.

Khadhri, A., Bouali, I., Belkhir, S., Mokded, R., Smiti, S., Falé, P., Araújo, M.E.M., Serralheiro, M.L.M.. 2017. *In vitro* digestion, antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of two species of *Ruta*: *Ruta chalepensis* and *Ruta montana*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1): 101–7.

Khan, Z.A., Naqvi, S.A.R., Mukhtar, A., Hussain, Z., Shahzad, S.A., Mansha, A., Ahmad, M., Zahoor, A.F., Bukhari, I.H., Janjua, M.R.S.A., Mahmood, N., Yar, M.. 2014. Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus rosa-sinensis* Linn flower extracts. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(3): 469–474.

Kläui, H.. 1979. Carotenoids and their applications. In: Counsell, J. N. and Dunastable, J. A., Eds., *Natural Colours for Food and Other Uses*. Applied Science, London, 91–122.

Koes, R.E.K., Quattrocchio, F., Mol, J.N.M.. 1994. The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution, *BioEssays*, 16(2): 123–132.

Konczak, I., Zhang, W.. 2004. Anthocyanins – more than nature’s colours. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 5: 239–240.

Leelaprakash, G., Dass, S.M.. 2011. *In vitro* anti-inflammatory activity of methanol extract of *Encicostemma axillare*. *International Journal of Drug Development and Research*, 3(3): 189–196.

Lewis, C.E., Walker, J.R.L., Lancaster, J.E.. 1995. Effect of polysaccharides on the colour of anthocyanins. *Food Chemistry*, 54: 315–319.

Lichtenhaler, H.K.. 1987. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes, *Methods in Enzymology*, 148: 350–382.

Lima, M.T.N.S., Santos, L.B. dos, Bastos, R.W., Nicoli, J.R., Takahashi, J.A.. 2017. Antimicrobial activity and acetylcholinesterase inhibition by extracts from chromatin modulated fungi. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(1): 169–176.

Ma, H. Xu, J., DaSilva, N.A., Wang, L., Wei, Z., Guo, L., Johnson. S.L., Lu, W., Gu, Q., Seeram, N. P.. 2017. Cosmetic applications of glucitol-core containing gallotannins from a proprietary phenolic-enriched red maple (*Acer rubrum*) leaves extract: Inhibition of melanogenesis via down-regulation of tyrosinase and melanogenic gene expression in B16F10 melanoma cells. *Archives of Dermatological Research*, 309(4): 265–274.

Macheix, J.-J., Fleuriet, A., Billot, J.. 1990. *Fruit Phenolics*. CRC Press, Boca Raton.

Mah, S.H., Teh, S.S., Ee, G.C.L.. 2017. Anti-inflammatory, anti-cholinergic and cytotoxic effects of *Sida rhombifolia*. *Pharmaceutical Biology*, 55(1): 920–928.

- Maciel, L.G., do Carmo, M.A.V., Azevedo, L., Daguer, H., Molognoni, L., de Almeida, M.M., Granato, D., and Rosso, N.D.. 2018. *Hibiscus sabdariffa* anthocyanins-rich extract: chemical stability, *in vitro* antioxidant and antiproliferative activities. *Food and Chemical Toxicology*, 113: 187-197.
- Majdoub, N., El-Guendouz, S., Rezgui, M., Carlier, J., Costa, C., Kaab, L. B. B., Miguel, M. G.. 2017. Growth, photosynthetic pigments, phenolic content and biological activities of *Foeniculum vulgare* Mill., *Anethum graveolens* L. and *Pimpinella anisum* L. (Apiaceae) in response to Zinc. *Industrial Crops and Products*, 109: 627–636.
- Mak, Y.W. Chuah, L.O., Ahmad, R., Bhat, R.. 2013. Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus* (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) and *Cassia* (*Senna bicapsularis* L.) flower extracts. *Journal of King Saud University - Science*, 25(4): 275–282.
- Markakis, P.. 1982. Anthocyanins as Food Colors. Academic Press, London.
- Meng, Y., Su, A., Yuan, S., Zhao, H., Tan, S., Hu, C., Deng, H., Guo, Y.. 2016. Evaluation of total flavonoids, myricetin, and quercetin from *Hovenia dulcis* Thunb. as inhibitors of  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase. *Plant Foods for Human Nutrition*, 71(4): 444–449.
- Miguel, M.G.. 2010. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15: 9252-9287.
- Mistry, T.V., Cai, Y., Lilley, T.H., Haslam, E.. 1991. Polyphenol interactions. Part 5 Anthocyanin co-pigmentation. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions*, 2: 1287–1296.
- Mohammed, A., Gbonjubola, V.A. Koorbanally, N.A., Islam, M.S.. 2017. Inhibition of key enzymes linked to type 2 diabetes by compounds isolated from *Aframomum melegueta* fruit. *Pharmaceutical Biology*, 55(1): 1010–1016.
- Muddathir, A.M., Yamauchi, K., Batubara, I., Mohieldin, E. A. M., Mitsunaga, T.. 2017. Anti-tyrosinase, total phenolic content and antioxidant activity of selected Sudanese medicinal plants. *South African Journal of Botany*, 109: 9–15.
- Naz, R., Ayub, H., Nawaz, S., Islam, Z.U., Yasmin, T., Bano, A., Wakeel, S.Z., Roberts, T. H.. 2017. Antimicrobial activity, toxicity and anti-inflammatory potential of methanolic extracts of four ethnomedicinal plant species from Punjab, Pakistan. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1): 1–14.
- Nayak, D., Ashe, S., Rauta, P.R., Nayak, B.. 2015. Biosynthesis, characterisation and antimicrobial activity of silver nanoparticles using *Hibiscus rosa-sinensis* petals extracts. *IET Nanobiotechnology*, 9(5): 288–293.
- Osama, A., Awadelkarim, S., Ali, A.. 2017. Antioxidant activity, acetylcholinesterase inhibitory potential and phytochemical analysis of *Sarcocephalus latifolius* Sm. bark used in traditional medicine in Sudan. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17(1), 1–11.
- Oszmianski, J., Lee, C.Y.. 1990. Inhibition of polyphenol oxidase activity and browning by honey. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 38(10): 1892–1895.
- Padmavati, M., Sakthivel, N., Thara, K.V., Reddy, A.R.. 1997. Differential sensitivity of rice pathogens to growth inhibition by flavonoids. *Phytochemistry*, 46: 499–502.

- Pekamwar, S.S., Kalyankar, T.M., Jadhav, A.C.. 2013. *Hibiscus rosa-sinensis*: A review on ornamental plant. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 2(6): 4719–27.
- Pettigrew, W.T., Vaughn, K.C.. 1998. Physiological, structural, and immunological characterization of leaf and chloroplast development in cotton. *Protoplasma*, 202: 23–37.
- Poovitha, S., Parani, M.. 2016. *In vitro* and *in vivo*  $\alpha$ -amylase and  $\alpha$ -glucosidase inhibiting activities of the protein extracts from two varieties of bitter melon (*Momordica charantia* L.). *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(Suppl 1): 1–9.
- Rao, R.S., Ravishankar, G.A.. 2002. Plant cell cultures: chemical factories of secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 20: 101–153.
- Rasheed, D.M., Porzel, A., Frolov, A., El Seedi, H.R., Wessjohann, L.A., Farag, M. A.. 2018. Comparative analysis of *Hibiscus sabdariffa* (roselle) hot and cold extracts in respect to their potential for  $\alpha$ -glucosidase inhibition. *Food Chemistry*, 250: 236–244.
- Raziq, N. Saeed, M., Ali, M.S., Zafar, S., Shahid, M., Lateef, M.. 2017. A new glycosidic antioxidant from *Ranunculus muricatus* L. (Ranunculaceae) exhibited lipooxygenase and xanthine oxidase inhibition properties. *Natural Product Research*, 31(11): 1251–57.
- Rehana, D., Mahendiran, D., Kumar, R.S., Rahiman, A.K.. 2017. *In vitro* antioxidant and antidiabetic activities of zinc oxide nanoparticles synthesized using different plant extracts. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(6): 943–957.
- Rice-Evans, C.A., Miller, N., Paganga, G.. 1997. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends in Plant Science*, 2: 152–159.
- Ridley, H.N.. 1930. *The Dispersal of Plants Throughout the World*. L. Reeve and Co., Ashford.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C.. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(98): 1231–37.
- Rwabahizi, S., Wrolstad, R.E.. 1988. Effects of mold contamination and ultrafiltration on the color stability of strawberry juice and concentrate, *Journal of Food Science*, 53: 857–861. 872.
- Solomon, S., Muruganatham, N., Senthamilselvi, M.M.. 2015. Anti-oxidant and anti-inflammatory activity of *Thespesia populnea* (Flowers). *Pharmacophore*, 6(1): 53–59.
- Saito, N., Tatsuzawa, F., Miyoshi, K., Shigihara, A., Honda, T.. 2003. The first isolation of C-glycosylanthocyanin from the flowers of *Tricyrtis formosana*. *Tetrahedron Letters*, 44: 6821–6823.
- Sarkar, B. Kumar, D., Sasmal, D., Mukhopadhyay, K.. 2014. Antioxidant and DNA damage protective properties of anthocyanin-rich extracts from *Hibiscus* and *Ocimum*: A comparative study. *Natural Product Research*, 28(17): 1393–1398.
- Scheller, H.V., Naver, H., Møller, B.L.. 1997. Molecular aspects of photosystem I. *Physiologia Plantarum*, 100: 842–851.
- Schwinn, K.E., Davies, K.M.. 2004. Flavonoids. In: Davies, K.M. (Ed.), *Plant Pigments and*

their Manipulation. Annual Plant Reviews, Volume 14. Blackwell Publishing, Oxford, pp. 92–149.

Segura-Carretero, A., Puertas-Mejía, M.A., Cortacero-Ramírez, S., Beltrán, R., Alonso-Villaverde, C., Joven, J., Dinelli, G., Fernández-Gutiérrez, A.. 2008. Selective extraction, separation, and identification of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. using solid phase extraction-capillary electrophoresis-massspectrometry (time-of flight/ion trap). *Electrophoresis*, 29, 2852-2861.

Soler-Rivas, C., Espín, J.C., Wichers, H.J.. 2000. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. *Phytochemical Analysis*, 338: 330–338.

Sousa, G.F.D., Aguilar, M.G.D., Takahashi, J.A., Alves, T.M.A., Kohlhoff, M., Vieira Filho, S.A., Silva, G.D.F., Duarte, L.P.. 2017. Flavonol triglycosides of leaves from *Maytenus robusta* with acetylcholinesterase inhibition. *Phytochemistry Letters*, 19: 34–38.

Steyn, W.J., Holcroft, D.M., Wand, S.J.E., Jacobs, G.. 2004. Regulation of pear color development in relation to activity of flavonoid enzymes. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 129: 6–12.

Steyn, W.J., Wand, S.J.E., Holcroft, D.M., Jacobs, G.. 2002. Anthocyanins in vegetative tissues: a proposed unified function in photoprotection. *New Phytologist*, 155: 349–361.

Strack, D., Wray V.. 1989. Anthocyanins. In: P. M. Dey and J. B. Harborne (Eds.) *Methods in Plant Biochemistry-Vol 1*, Academic Press, New York, pp. 325–356.

Swain, T., Bate-Smith, E.C.. 1962. Flavonoid Compounds. In: Florkin, M. and Mason, H. S., Eds., *Comparative Biochemistry Vol. III: Constituents of Life. Part A*, Academic Press, New York, 755–809.

Takahashi, A., Takeda, K., Ohnishi, T.. 1991. Light-induced anthocyanin reduces the extent of damage to DNA in UV-irradiated *Centaurea cyanus* cells in culture. *Plant and Cell Physiology*, 32: 541–547.

Thitimuta, S., Pithayanukul, P., Nithitanakool, S., Bavovada, R., Leanpolchareanchai, J., Saparpakorn, P.. 2017. *Camellia sinensis* L. extract and its potential beneficial effects in antioxidant, anti-inflammatory, anti-hepatotoxic, and anti-tyrosinase activities. *Molecules*, 22(3), doi: 10.3390/molecules22030401.

Thomson, R. H.. 1962. Quinones: structure and distribution. In: Florkin, M. and Mason, H. S., Eds., *Comparative Biochemistry Vol. III: Constituents of Life. Part A*, Academic Press, New York, 631–725.

Vijayalakshmi, M., Ruckmani, K.. 2016. Ferric reducing anti-oxidant power assay in plant extract. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(3): 570–572.

Wang, C.-J., Wang, J.-M., Lin, W.-L., Chu, C.-Y., Chou, F.-P., Tseng, T.-H.. 2000. Protective effect of *Hibiscus* anthocyanins against *tert*-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 38: 411-416.

Wang, L., Li, X.. 2011. Antioxidant activity of durian (*Durio zibethinus* Murr.) shell *in vitro*. *Asian Journal of Pharmaceutical and Biological Research*, 1(4): 542–551.

Waszkowiak, K., Gliszczyńska-Świąło, A., Barthet, V., Skręty J.. 2015. Effect of extraction

method on the phenolic and cyanogenic glucoside profile of flaxseed extracts and their antioxidant capacity. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 92(11–12): 1609–1619.

Weiss, D.. 2000. Regulation of flower pigmentation and growth: multiple signaling pathways control anthocyanin synthesis in expanding petals. *Physiologia Plantarum*, 110: 152–157.

Wheldale, M.. 1916. *The Anthocyanin Pigments of Plants*. Cambridge University Press, Cambridge.

Woodall, G.S., Stewart, G.R.. 1998. Do anthocyanins play a role in UV protection of the red juvenile leaves of *Syzygium*? *Journal of Experimental Botany*, 49: 1447–1450.

Wong, D.W.S.. 1989. Colorants. In: *Mechanism and Theory in Food Chemistry*, AVI, Westport, CT, 147– 187.

Wong, S.K., Lim, Y.Y., Chan, E.W.C.. 2009. Antioxidant properties of *Hibiscus*: Species variation, altitudinal change, coastal influence and floral colour change. *Journal of Tropical Forest Science*, 21(4): 307–315.

Vankar, P.S., Shukla, D.. 2011. Natural dyeing with anthocyanins from *Hibiscus rosa-sinensis* flowers. *Journal of Applied Polymer Science*, DOI 10.1002/app.

Xie, P.-j. Huang, L.-x., Zhang, C.-h. Ding, S.-s., Deng, Y.-j. Wang, X.-j.. 2018. Skin-care effects of dandelion leaf extract and stem extract: Antioxidant properties, tyrosinase inhibitory and molecular docking simulations. *Industrial Crops and Products*, 111: 238–246.

Yusri, N., Chan, K., Iqbal, S., Ismail, M.. 2012. Phenolic content and antioxidant activity of *Hibiscus cannabinus* L. seed extracts after sequential solvent extraction. *Molecules*, 17(12): 12612–12621.

Zhang, Y., Shen, Y., Yongchao, Z., Xu, Z.. 2015. Assessment of the correlations between reducing power, scavenging DPPH activity and anti-lipid-oxidation capability of phenolic antioxidants. *LWT - Food Science and Technology*, 63(1): 569–574.

Zhao, A., Li, L., Li, B., Zheng, M., Tsao, R.. 2016. Ultrafiltration LC-ESI-MS<sup>n</sup> screening of 5-lipoxygenase inhibitors from selected Chinese medicinal herbs *Saposhnikovia divaricata*, *Smilax glabra*, *Pueraria lobata* and *Carthamus tinctorius*. *Journal of Functional Foods*, 24: 244–253.

Zhao, P., Chen, K., Zhang, G., Deng, G., Li, J.. 2017. Pharmacological basis for use of *Selaginella moellendorffii* in gouty arthritis: Antihyperuricemic, anti-Inflammatory, and xanthine oxidase inhibition. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2017, 1–10, doi: 10.1155/2017/2103254. Epub 2017.

Nota: Este documento segue a ortografia de 1945.