

Estudo da Atividade Antioxidante de *Hibiscus Sabdariffa* e sua Possível Aplicação na Conservação dos Alimentos

Janicy A. Carvalho, Alexandro da S. Abreu, Milton B. Junior & Andreza R. Simioni

Nos últimos anos, têm crescido a preocupação por uma alimentação de qualidade e natural. Estudos mostram que algumas plantas do gênero *Hibiscus* possuem propriedades antioxidantes e devido a essas propriedades, podem ser estudadas como um possível agente antioxidante natural e alternativo para alimentos. O presente trabalho teve como objetivo estudar o potencial antioxidante de extratos das flores de *H. sabdariffa* utilizando diferentes técnicas de extração, além de realizar sua incorporação em nanopartículas de gelatina. As nanopartículas foram sintetizadas pelo método de dessolvatação em dois passos e caracterizadas quanto a sua morfologia, potencial zeta, distribuição de tamanho e eficiência de encapsulamento.

Palavras-chave: *antioxidante; Hibiscus sabdariffa; nanopartículas.*

In recent years, has been growing the concern for a quality and natural food. Studies show that some plants of the genus *Hibiscus* have antioxidant properties and due to these properties, they can be studied as a possible alternative and natural antioxidant agent for foods. The objective of this work was to study the antioxidant potential of extracts of the flowers of *H. sabdariffa* using different extraction techniques, in addition to performing their incorporation into gelatin nanoparticles. The nanoparticles were synthesized by the two-step desolvation method and characterized according to their morphology, zeta potential, size distribution and encapsulation efficiency.

Keywords: *antioxidant; Hibiscus sabdariffa; nanoparticles.*

Introdução

Os alimentos e seus derivados são compostos suscetíveis a transformações biológicas por várias formas de vida microbiana. O crescimento destes microrganismos nos produtos é a principal causa da sua deterioração. Os principais constituintes dos alimentos são carboidratos, proteínas, lipídios, minerais, água, vitaminas, enzimas, ácidos e gases dissolvidos, muitos dos quais podem ser reativos nas condições usadas para processamento e armazenamento. Essa reatividade também se torna um problema para a degradação do alimento.¹

Tendo em vista esses fatores, alguns aditivos são utilizados para aumentar o tempo de prateleira dos produtos e combater os problemas descritos. Esses aditivos são denominados estabilizantes e são substâncias que permitem manter o estado físico-químico de um alimento e podem ser divididos principalmente em dois tipos: antioxidantes e conservantes.² Antioxidantes são compostos que possuem a capacidade de retardar ou inibir a oxidação dos lipídios ou outras substâncias, evitando a propagação das reações de oxidação por meio da absorção e neutralização de radicais livres, quelando o oxigênio triplete e singleto ou decompondo peróxidos.³

Os consumidores estão mais conscientes da relação entre os alimentos e a saúde e tendem a dar preferência a ingredientes provenientes de fontes naturais e não a aditivos sintéticos.⁴ A utilização de extratos vegetais na alimentação está associada com o conhecimento e domínio das propriedades das plantas.⁵

Dentre as plantas, destaca-se o *Hibiscus sabdariffa* pela sua diversidade de uso na produção de chás, geleias, licores entre outros, fazendo dela uma alternativa tanto para os produtores rurais quanto para os consumidores.⁶ Diversos estudos têm demonstrado que o *H. sabdariffa* possui uma gama de efeitos terapêuticos, sendo capaz de atuar como laxante, aumentar a diurese, atenuar cólicas uterinas e gastro-intestinais, possui propriedades anti-escorbútica, emoliente, estimulante, afrodisíaco, adstringente,⁶ hepatoprotetor e antibacteriana,⁷ antioxidante,^{8,9} antiolesterol,¹⁰ anticâncer¹¹ e anti-hipertensivo,¹² No *Hibiscus*, as antocianinas

desempenham função antioxidante, proteção à ação da luz, mecanismo de defesa e função biológica.¹³

A nanotecnologia se transformou em uma área de pesquisa de grande interesse para os cientistas de alimentos, uma vez que as nanopartículas podem levar a melhorias na biodisponibilidade de nutrientes.⁶ Para tal realiza-se o processo de encapsulamento, que se trata de um empacotamento dos compostos bioativos. Por exemplo, pode-se encapsular pigmentos, enzimas, acidulantes, nutrientes, etc., em cápsulas que sejam compatíveis com o organismo humano.¹⁴

A finalidade da encapsulação na indústria de alimentos é proteger os compostos contra oxidação química e/ou fatores do ambiente como luz e temperatura. Além disso, a partícula pode ser projetada para liberar o produto aos poucos com o passar do tempo ou até que determinada condição seja alcançada.¹⁵

A gelatina é uma proteína derivada da hidrólise parcial do colágeno com a capacidade de formar um gel quando misturada com água. Trata-se de um polímero com propriedades aniônicas ou catiônicas em condições ácidas ou básicas respectivamente, que lhe confere um equilíbrio dinâmico associado à neutralização das soluções de gelatina.¹⁶

¹⁷ É utilizada em diversas áreas devido às suas propriedades mecânicas, origem biológica natural, biodegradabilidade e biocompatibilidade em meio fisiológico, além de ser incolor, inodora e não-irritante.^{17, 18} As nanopartículas de gelatina (NPG) vêm recebendo atenção especial por oferecerem uma boa opção devido ao seu baixo custo e sua aplicação em diversos tipos de formulações.^{19, 20}

Este trabalho teve como objetivo estabelecer a melhor condição de extração das flores de *H. sabdariffa* de modo a obter os componentes bioativos, verificar seu potencial antioxidante e realizar a sua incorporação em NPG visando a aplicação como conservante natural e alternativo para alimentos.

Materiais e Métodos

Utilizou-se flores de *Hibiscus sabdariffa* adquiridas secas e comercializadas pela INDÚSTRIA E COMÉRCIO NATTUDAY LTDA. O material adquirido foi triturado e armazenado em recipiente devidamente fechado à

temperatura ambiente, protegido da luz e em ambiente seco juntamente com sílica gel para evitar absorção de umidade do ambiente preservando-o até a realização do experimento.

Os métodos de extração selecionados para este estudo foram: maceração, extração por ultrassom e extração com Soxhlet. Para cada extração utilizou-se três solventes com grau de polaridade diferente sendo eles hexano, acetato de etila e metanol. Para a maceração utilizou-se amostras com 20 g de hibisco seco com um volume de 250 mL de cada solvente. A extração ocorreu por 8 dias em temperatura ambiente (25 °C) sobre proteção da luz, agitando-se esporadicamente durante este período com um bastão de vidro.

Para a extração com ultrassom utilizou-se um equipamento com potência de 120W e frequência de 40kHz. Foram empregadas amostras de 20g de hibisco e um volume de 200mL de cada solvente. A extração ocorreu durante 270min mantendo a temperatura do equipamento constante (27 °C) de modo que esta não influenciasse na extração.

Já na extração Soxhlet, para cada solvente realizou-se duas extrações contendo 10 g de hibisco e 150mL de solvente em sistema Soxhlet convencional durante 16h com a troca dos solventes a cada 8h para evitar a sua saturação e a decomposição térmica dos extratos. Ao término, os extratos foram filtrados através de um funil utilizando papel filtro quantitativo, concentrados por rotaevaporação e secos em estufa.

Para purificar e isolar os compostos de interesse optou-se por fazer uma semi-purificação aplicando o fracionamento líquido-líquido que se trata de um processo de partição dos compostos presentes na amostra através de suas afinidades com solventes de polaridades diferentes.²¹ O processo é realizado a partir da diluição da amostra em água e posteriormente a passagem de solventes com polaridades crescentes e imiscíveis em água, como hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol.

A capacidade antioxidante foi determinada pelo método de sequestro de radicais livres pelo reagente 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH·).²² O método baseia-se na capacidade redutora dos antioxidantes, presentes na amostra, sobre o DPPH·, um radical estável, através de uma reação de transferência de elétrons, a qual é medida através do decréscimo da absorbância a 515nm.

Utilizando curvas padrão estabelecidas do radical e do padrão Trolox como referência, determinou-se o potencial antioxidante dos extratos expressos em μmol equivalentes de Trolox/g de amostra. Já a determinação do teor de antocianinas monomérica total foi feita utilizando o método do pH diferencial.²³

As NPG foram preparadas usando o método de dessolvatação seguindo a metodologia descrita por Carvalho e colaboradores (2018).²⁴ Para o carregamento do extrato nas nanopartículas, adicionou-se 50,4mg do extrato em uma solução aquosa de partículas, deixando em contato por 48h. Após este tempo, a solução foi dividida, centrifugada a 7000rpm durante 20min, lavada com a de acetona (75%) por três vezes e o material sedimentado foi diluído com água deionizada.

A morfologia externa das NPG foi examinada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). Foram analisados os potenciais zeta das NPG antes do encapsulamento do extrato e após, com a finalidade de verificar o encapsulamento do princípio ativo no sistema nanoestruturado. A distribuição de tamanhos das NPG assim como o seu diâmetro médio foram determinados por Espalhamento Dinâmico de Luz (DLS).

A concentração do extrato nas partículas foi quantificada pela curva de calibração e Lei de Lambert-Beer, que relaciona a absorção de luz do composto com suas propriedades específicas.²⁵ Para que essa concentração fosse determinada, o extrato incorporado nas nanopartículas foi extraído em solução alcoólica de dimetilsulfóxido (DMSO) 10% (v/v) e analisado utilizando um espectrofotômetro. A eficiência de encapsulamento (%E) do extrato nas partículas foi calculada de acordo com a equação (1):²⁶

$$\%E = \frac{M_{\text{atual}}}{M_{\text{teórica}}} \times 100 \quad (1)$$

onde, M_{atual} é a massa de extrato calculado pela Lei de Lambert-Beer e $M_{\text{teórica}}$ é a massa que foi adicionada na formulação.

Resultados e Discussão

Realizou-se a extração das flores de *H. sabdariffa* com três solventes (hexano, acetato de etila e metanol) de

polaridades diferentes e utilizando três métodos de extração (maceração, ultrassom e Soxhlet). Apesar da toxicidade apresentada pelo metanol, ele é o solvente mais adequado para obtenção de um extrato bruto, pois possibilita a extração de um maior número de compostos.²¹

Após secar cada um dos extratos, determinou-se a massa obtida. Os resultados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1. Massa de extrato obtida para cada método de extração e solvente utilizado.

	Extratos Hexano (g)	Extratos Acetato de Etila (g)	Extratos Metanol (g)
Ultrassom	0,03	0,43	5,56
Maceração	0,08	0,98	6,09
Soxhlet	0,20	1,44	7,55

A partir desses resultados calculou-se por gravimetria a eficiência das extrações realizadas. Os valores encontram-se na Figura 1.

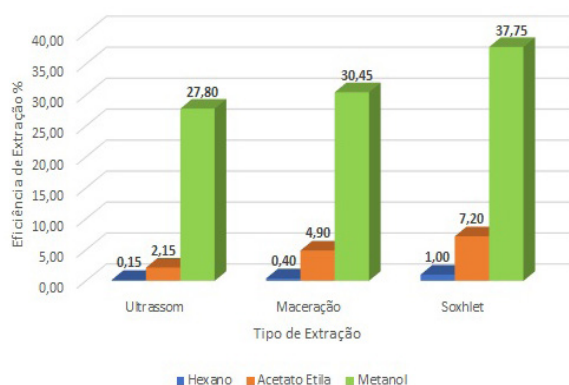


Figura 1. Eficiência de extração para cada método utilizado.

Diante dos dados, pode-se afirmar que a polaridade do solvente teve influência significativa independentemente do método de extração utilizado, tendo o metanol como o solvente que apresentou melhor eficiência. Guindani et al. (2014) observaram que o mesmo solvente proporcionou a melhor condição de extração de compostos fenólicos presentes no *H. sabdariffa*.²⁷

Utilizando as curvas padrão estabelecidas e linearizações das atividades antioxidantes, determinou-se o potencial

antioxidante dos extratos expressos em μmol equivalentes de Trolox/g de amostra. Os resultados obtidos encontram-se na Figura 2.

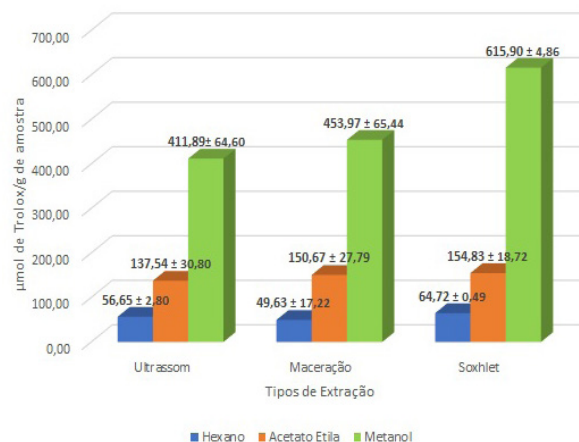


Figura 2. Potencial antioxidante dos extratos de *H. sabdariffa*.

De modo geral, observa-se que os extratos metanólicos apresentaram maior capacidade antioxidante dentre os outros, com destaque para o extrato metanólico obtido pelo Soxhlet.

A análise de variância (ANOVA) foi realizada para os valores obtidos de modo a verificar a influência do solvente e do tipo de extração nos resultados. A partir da análise verificou-se que o tipo de extração não influenciou significativamente no potencial antioxidante da amostra ($p = 0,91699$), já a polaridade do solvente utilizado influenciou ($p = 0,00032$).

Alguns resultados de potencial antioxidante apresentaram erros maiores devido a sensibilidade do método utilizado. Esse fator pode ser comprovado através de dados da literatura, onde são encontrados erros de até 20%. Os extratos preparados nesse estudo obtiveram melhores resultados de potencial antioxidante do que outros relatados na literatura preparados de diversas fontes, como por exemplo o bagaço de maçã ($39,15 \pm 2,27 \mu\text{mol Trolox/g}$),²⁸ mirtilo ($27,60 \pm 5,33 \mu\text{mol Trolox/g}$),²⁹ amora ($20,35 \pm 3,25 \mu\text{mol Trolox/g}$)²⁹ e cupuaçu ($19,00 \pm 1,00 \mu\text{mol Trolox/g}$).³⁰ Em comparação

com o chá de hibisco ($70,26 \pm 16,64 \mu\text{mol Trolox/g}$),³¹ os extratos preparados com em acetato de etila e metanol obtiveram um potencial superior.

O teor de antocianinas presentes nos extratos foi examinado pelo método do pH diferencial que leva em consideração a sua mudança de coloração quando expostas a mudança de pH, passando de coloração avermelhada (pH 1,0) para incolor (pH 4,5). Para o teste aplicado detectou-se o composto apenas para os extratos metanólicos. Os resultados estão representados na Figura 3 em mg de antocianinas/g de amostra.

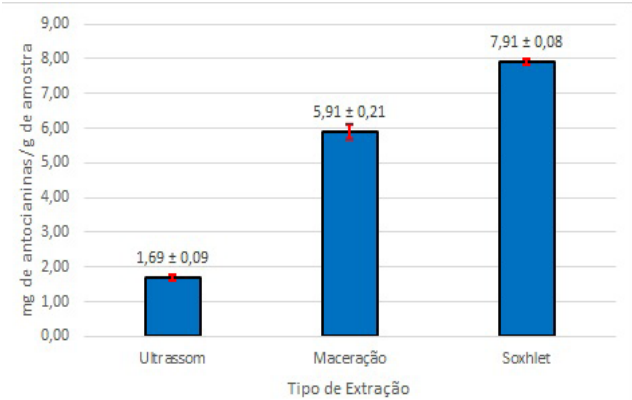


Figura 3. Teor de antocianinas nos extratos metanólicos. ,

Os resultados para os extratos metanólicos obtidos por Soxhlet, apresentou um teor de antocianinas superior a diversos valores reportados na literatura.^{29, 31, 33} Os extratos metanólicos obtiveram os melhores resultados de potencial antioxidante e foram os únicos onde foi possível detectar a presença das antocianinas. Uma vez que o extrato metanólico obtido por Soxhlet apresentou os melhores resultados dentre todos os extratos, realizou-se o fracionamento líquido-líquido desse, de modo a isolar as antocianinas e os compostos fenólicos. As frações foram concentradas por rotaevaporação e secas em estufa a 40 °C. A massa obtida de cada fração e a eficiência do fracionamento podem ser visualizadas na Tabela 2.

Após, analisou-se as frações em função do teor de antocianinas e do potencial antioxidante. Detectou-se antocianinas apenas na fração de n-butanol com um

valor de $10,24 \pm 0,04 \text{ mg de antocianinas/g de extrato}$. O resultado do potencial antioxidante pode ser visualizado na Figura 4.

Tabela 2. Massa e eficiência após o fracionamento líquido-líquido.

Fração	Massa Obtida (g)	Eficiência Fracionamento (%)
Hexano	0,19	2,56
Diclorometano	017	2,29
Acetato de Etila	0,7	9,43
n-Butanol	2,8	37,71

A presença das antocianinas na fração n-butanol é esperada, uma vez que este solvente possui maior afinidade com os flavonóides glicosados.²¹ Como nessa fração as antocianinas encontram-se mais concentradas, o potencial antioxidante será maior do que o obtido anteriormente para o extrato com Soxhlet e metanol. O alto potencial antioxidante da fração acetato de etila pode ser justificado pela presença de outros flavonóides e compostos fenólicos em geral.²¹ Como as características apresentadas pela fração n-butanol foram superiores, realizou-se a sua incorporação nas NPG.

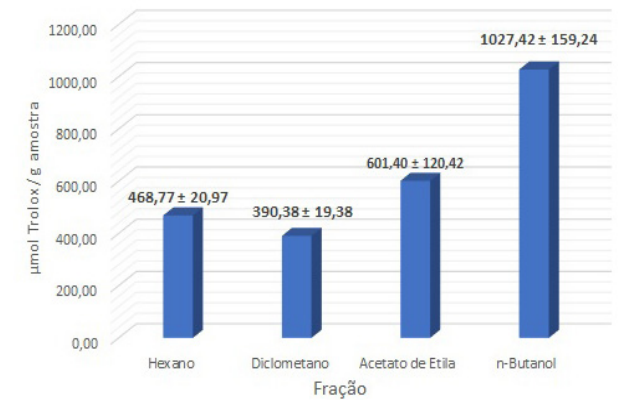


Figura 4. Potencial antioxidante do Fracionamento líquido-líquido.

Analisou-se a morfologia externa das NPG sem e com a incorporação da fração n-butanol, conforme Figura 5.

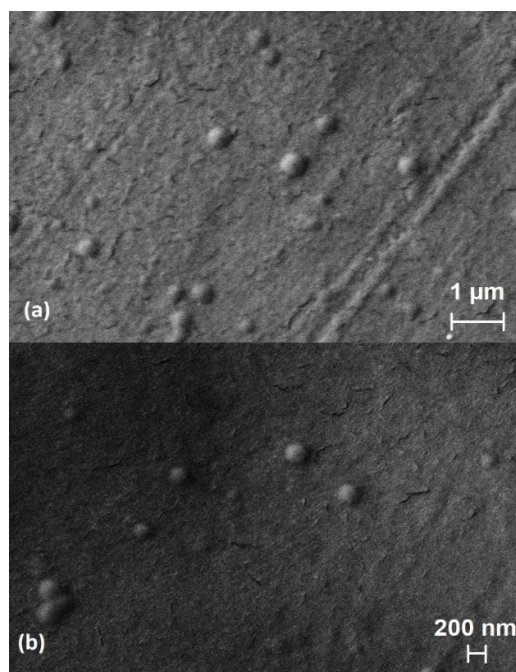


Figura 5. Morfologia externa das nanopartículas, sendo (a) sem e (b) com a incorporação da fração n-butanol.

Os resultados apresentados mostram que as NPG produzidas apresentam tamanho uniforme e morfologia esférica em ambos os casos, características típicas destes sistemas.³⁴

O potencial zeta é um importante parâmetro físico-químico que influencia na estabilidade das nanossuspensões. Valores de potencial zeta extremamente positivos ou negativos causam maiores forças repulsivas, essa repulsão entre partículas com carga elétrica similar previne a agregação e assegura assim uma fácil redispersão.²⁴ O potencial zeta das NPG antes e após incorporação foi monitorado e revelou um valor médio de $23,00 \pm 6,74$ mV e $18,70 \pm 5,98$ mV, respectivamente.

Segundo Honary et al. (2013), nanopartículas com potencial superior a 20 mV apresentam boa estabilidade em solução à curto prazo.³⁵ A carga superficial das partículas e o tipo de ligação entre a amostra e as nanopartículas são parâmetros importantes que determinam a taxa de desorção e a eficiência de encapsulamento. Desta forma,

o potencial zeta pode ser usado para determinar se um material foi encapsulado no centro da nanopartícula ou depositado na superfície, porque se a amostra for protegida pelas nanopartículas, o potencial zeta após a incorporação será próximo do potencial zeta inicial.³⁵ Portanto, pode-se afirmar que a fração n-butanol foi incorporada com sucesso pelas NPG, uma vez que os resultados obtidos estão dentro dos valores de limite de erro da análise.

A Figura 6 apresenta os resultados de distribuição de tamanho das NPG, antes e depois da incorporação da fração n-butanol.

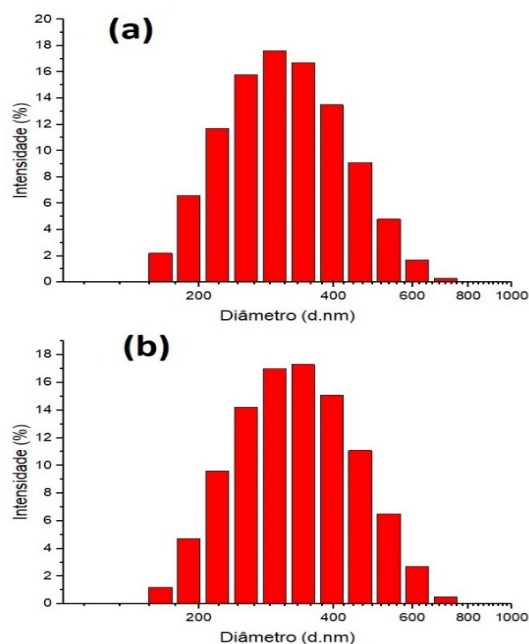


Figura 6. Distribuição de tamanho das nanopartículas, sendo (a) antes e (b) após a incorporação do extrato.

As NPG produzidas apresentaram diâmetro hidrodinâmico médio de $299,8 \pm 101,1$ nm e índice de polidispersividade de 0,097. Após o encapsulamento, o diâmetro foi de $315,1 \pm 106,5$ nm e o índice de 0,094. O Índice de Polidispersividade é um indicativo da faixa de variação das propriedades da amostra, o ideal é que ele seja o menor possível para que a variação nas propriedades seja minimizada.

A eficiência de encapsulamento foi determinada através de curva de calibração e Lei de Lambert-Beer. Como pode ser observado na Figura 7, o extrato teve um coeficiente de correlação linear igual 0,9997 para a curva de calibração estabelecida.

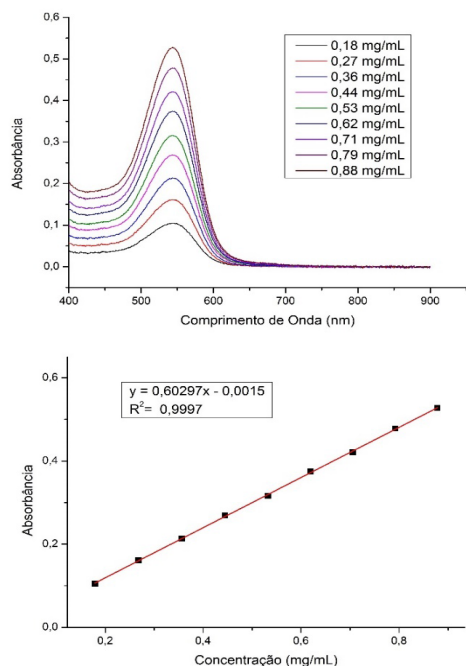


Figura 7. Curva de calibração da fração n-butanol em solução alcoólica de DMSO 10%.

A Eficiência de Encapsulamento (%E) obtida foi de 61,52%. Este resultado mostra que as NPG conseguiram incorporar 61,52% do extrato colocado, resultado relativamente bom quando comparado a outros já obtidos para o mesmo modelo de partícula. Saxena et al. (2005), por exemplo, obteve uma eficiência de até 41% para o encapsulamento de um inibidor de síntese proteica (Cicloheximida) em NPG produzidas pelo método de dessolvatação em dois passos.³⁶

Conclusão

Conseguiu-se realizar as extrações propostas e a partir dos resultados verificou-se que a polaridade do solvente teve influência significativa independentemente do método

de extração utilizado, sendo o metanol o solvente que apresentou as melhores eficiências.

Os compostos extraídos apresentaram um potencial antioxidante expressivo quando comparados com resultados da literatura, com destaque para a extração por Soxhlet utilizando metanol como solvente extrator. Detectou-se a presença das antocianinas apenas nos extratos metanólicos, sendo que o resultado obtido pelo método com Soxhlet ($7,91 \pm 0,08$ mg de antocianinas/g de amostra) apresentou um teor superior aos valores encontrados na literatura.

Com o fracionamento líquido-líquido do extrato metanólico obtido por Soxhlet, conseguiu-se isolar as antocianinas na fração de n-butanol concentrando-as para $10,24 \pm 0,04$ mg de antocianinas/g de extrato e maximizar o seu potencial antioxidante para $1027,42 \pm 159,24$ μ mol equivalentes de Trolox/g de amostra. Conseguiu-se sintetizar as nanopartículas de gelatina, com as características necessárias para serem utilizadas como sistema de liberação na indústria alimentícia, apresentando morfologia esférica, diâmetro hidrodinâmico médio de $299,8 \pm 101,1$ nm com índice de polidispersividade de 0,097 antes da incorporação e diâmetro de $315,1 \pm 106,5$ nm com índice de 0,094 após a incorporação.

O potencial zeta das partículas antes e após incorporação foi monitorado e revelou um valor médio de $23,00 \pm 6,74$ mV e $18,70 \pm 5,98$ mV, respectivamente. Esses valores indicam que as nanopartículas apresentam boa estabilidade em solução à curto prazo e que a incorporação foi realizada com sucesso. Além disso, realizou-se a incorporação da fração n-butanol com uma eficiência de 61,52%. Deste modo, conclui-se que o extrato incorporado em nanopartículas de gelatina possui potencial como agente antioxidante para alimentos.

Referências

1. JELEN, P. Ullmann's Encycl. Ind. Chem. **2000**, 15, 633-670.
2. KUHNERT, P. Ullmann's Encycl. Ind. Chem. **2016**, 1-52.
3. DEGÁSPARI, C. H.; Waszczyński, N. Visão Acadêmica. **2004**, 5(1), 33-40.
4. SHIPE, W. F. Ullmann's Encycl. Ind. Chem. **2014**, 1-23.

5. GABBI, A. M. Aditivo fitogênico na alimentação de novilhas leiteiras da raça jersey: parâmetros zootécnicos, hematológicos e comportamentais. **2004**. 52 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, RS, Brasil, **2004**.
6. CASTRO, N. E. A. Época de Plantio e Método de Colheita para Maximização da Produção de Cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. 2003. 79 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, **2003**.
7. LIU, J.; Chen, C.; WANG, W.; Hsu, J.; Yang, M.; Wang, C. Food Chem. Toxicol. **2006**, 44, 336-343.
8. OLATUNDE, F. E.; Fakoya, A. Mol. Nutr. Food Res. **2005**, 49, 1120-1128.
9. RAMAKRISHNA, B. V.; Jayaprakasha, G. K.; Jena, B. S.; Singh, R. P. J. Food Sci. Technol. **2008**, 45, 223-227.
10. LIN, T. L. et al. *Hibiscus sabdariffa* extract reduces serum cholesterol in men and women. Nutrition Research, v.27, p.140-145, **2007**.
11. OLVERA-GARCIA, V. et al. *Hibiscus sabdariffa* L. extracts inhibit the mutagenicity in microsuspension assay and the proliferation of HeLa cells. Journal of Food Science, v.73, p.75-81, **2008**.
12. HERRERA-ARELLANO, A. et al. Clinical effects produced by a standardized herbal medicinal product of *Hibiscus sabdariffa* on patients with hypertension. A randomized, double-blind, lisinopril-controlled clinical trial. Planta Medica, v.73, p.6-12, **2007**.
13. LOPE, T. J. et al. Antocianinas: Uma Breve Revisão das Características Estruturais e da Estabilidade. Revista Brasileira de Agrociência, Pelotas, v. 13, n. 3, p.291-297, jul./set. **2007**.
14. AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. Alimentos e Nutrição, v. 16, n. 1, p. 89-97, **2005**.
15. BARROS, F. A. R.; STRINGHETA, P. C. Microencapsulamento de ANTOCIANINAS: Uma alternativa para o aumento de sua aplicabilidade como ingrediente alimentício. Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento, ano IX, n. 36, p. 18-24, jan./jun. **2006**.
16. XING, F. et al. Nanoencapsulation of Capsaicin by Complex Coacervation of Gelatin, Acacia, and Tannins. Journal of Applied Polymer Science, v. 96, p.2225-2229, **2005**.
17. KAUL, G.; AMIJI, M. Long-Circulating Poly(Ethylene Glycol)-Modified Gelatin Nanoparticles for Intracellular Delivery. Pharmaceutical Research, v. 19, p.1061-1067, **2002**.
18. IWAMOTO, S. et al. Preparation of Gelatin Microbeads With a Narrow Size Distribution Using Microchannel Emulsification. Aaps Pharmscitech, v. 3, p.1-5, **2002**.
19. KUIJPERS, A.J. et al. In vivo compatibility and degradation of crosslinked gelatin gels incorporated in knitted Dacron. Journal of Biomedical Materials Research, v. 51, p.136-145, **2000**.
20. YAO, C.H. et al. Biocompatibility and biodegradation of a bone composite containing tricalcium phosphate and genipin crosslinked gelatin. Journal of Biomedical Materials Research: Part A, v. 69, p.709-717, **2004**.
21. CECHINEL FILHO, V.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Química Nova, v. 21, n. 1, p.99-105, **1998**.
22. RUFINO, M. S. M. et al. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. EMBRAPA Comunicado Técnico, v.1, p. 1-4, **2007**.
23. AOAC. Official Methods of Analysis. 18. ed. Gaithersburgs: Association of Official Analytical Chemists, **2006**.
24. CARVALHO, J. A. et al. Preparation of gelatin nanoparticles by two step desolvation method for application in photodynamic therapy. Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition, v. 29, n. 11, p.1287-1301, 27 mar. **2018**. DOI: <http://dx.doi.org/10.1080/09205063.2018.1456027>.
25. SIQUEIRA-MOURA, M. P. et al. Validated spectrophotometric and spectrofluorimetric methods for determination of chloroaluminum phthalocyanine in nanocarriers. Pharmazie, v. 65, p.9-14, **2010**.
26. LI, J. K.; WANG, N.; WU, X. S. A Novel Biodegradable System Based on Gelatin Nanoparticles and Poly(lactic-co-glycolic acid) Microspheres for Protein and Peptide Drug Delivery. Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 86, p.891-895, **1997**.
27. GUINDANI, M. et al. Estudo do Processo de Extração dos Compostos Fenólicos e Antocianinas Totais do *Hibiscus sabdariffa*. In: XX CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA, 20., 2014, Florianópolis. Anais... Florianópolis: Associação Brasileira de Engenharia Química, **2014**. p. 1 - 7.
28. SOARES, M. et al. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 28, n. 3, p.727-732, jul./set. **2008**.
29. SELLAPPAN, S.; AKOH, C. C.; KREWER, G. Phenolic Compounds and Antioxidant Capacity of Georgia-Grown Blueberries and Blackberries. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, n. 8, p.2432-2438, abr. 2002. DOI: <http://dx.doi.org/10.1021/jf011097r>.
30. GONÇALVES, A. E. S. S. Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonóides e vitamina C. 2008. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, **2008**.

31. NUNES, S. P.; THOMAS, A. B.; LIMA, L. C. O. Compostos Fenólicos, Antocianinas e Atividade Antioxidante em Chá De Hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.). In: CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPA, 23., 2014, Lavras. Anais... Lavras: Universidade Federal de Lavras, **2014**. p.1-6.
32. MACIEL, M. J. et al. Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante. Revista do Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, v. 71, n. 3, p.462-470, **2012**.
33. TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P. C.; OLIVEIRA, F. A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. Revista Ceres, v. 55, n. 4, p.297-304, jul./ago. **2008**.
34. SIMIONI, A. R. et al. Evaluation of the Binding Properties of Maghemite Nanoparticle Surface-Coated with Meso-2-3-Dimercaptosuccinic Acid to Serum Albumin. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, v. 8, p.5813-5817, **2008**.
35. HONARY, S.; ZAHIR, F. Effect of Zeta Potential on the Properties of Nano-Drug Delivery Systems - A Review (Part 2). Tropical Journal of Pharmaceutical Research, v. 12, n. 2, p.265-273, 9 maio **2013**. DOI: <http://dx.doi.org/10.4314/tjpr.v12i2.20>.
36. SAXENA, A. et al. Effect of molecular weight heterogeneity on drug encapsulation efficiency of gelatin nano-particles. Elsevier: Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 45, p.42-48, **2005**.

Janicy A. Carvalho, Alexandro S. Abreu, Milton B. Junior & Andreza R. Simioni*

Laboratório de Sistemas Micro e Nanoparticulados, Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento, Universidade do Vale do Paraíba, São José dos Campos. Av. Shishima Hifumi, nº 2911, CEP 12244000, Brasil.

*E-mail: simioni@univap.br