



**INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
EGAS MONIZ**

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**ESTUDO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA PHYSALIS E
REVISÃO DA SUA APLICAÇÃO NA ÁREA DA SAÚDE**

Trabalho submetido por
Filipa Alexandra Jorge Antunes
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

setembro de 2016



INSTITUTO SUPERIOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE EGAS MONIZ

MESTRADO INTEGRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

ESTUDO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA PHYSALIS E REVISÃO DA SUA APLICAÇÃO NA ÁREA DA SAÚDE

Trabalho submetido por
Filipa Alexandra Jorge Antunes
para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas

Trabalho orientado por
Prof.^a Doutora Margarida Maria de Mesquita Cabral de Moncada

e coorientado por
Prof.^a Doutora Alexandra Bernardo

setembro de 2016

Dedicatória

*Ao meu tio Bento que, mesmo sem saber,
colaborou nesta caminhada todos os dias.*

Agradecimentos

À Cooperativa de Ensino Superior Egas Moniz, na pessoa do Professor Doutor Martins dos Santos, por ter disponibilizado as suas instalações e equipamento necessários à realização desta monografia.

À minha orientadora Prof. Doutora Margarida Moncada, que investiu neste projeto tanto quanto eu, estando sempre presente e contribuindo não só com o seu conhecimento, mas também o seu apoio e dedicação.

À minha coorientadora Prof. Doutora Alexandra Bernardo por toda a disponibilidade, orientação e partilha de conhecimento.

À Professora Doutora Fernanda Mesquita, por disponibilizar as instalações e equipamento do BioquiLab para alguns procedimentos da parte experimental desta monografia.

Ao Professor Doutor Fernando Pina por me receber no laboratório de fotoquímica da Faculdade de Ciências e Tecnologias da Universidade Nova de Lisboa e permitir que lá se realizasse parte desta investigação.

Aos meus pais, que tornaram tudo isto possível e a quem devo as horas de conforto e carinho nos momentos mais difíceis.

Ao Ricardo, a minha estrela guia e o reservatório de toda a força e motivação que precisei incondicionalmente para realizar este projeto.

Às minhas irmãs Catarina e Raquel pelos momentos de força, de riso, de motivação e por estarem sempre presentes, fisicamente ou não, durante todo este percurso.

A todos os meus amigos e restantes familiares pelas palavras de apoio e carinho nas horas mais difíceis e por me fazerem acreditar que seria possível concretizar este projeto.

Resumo

Enquadramento: A *physalis* é uma planta utilizada desde há muito empiricamente como analgésico na epigastrialgia, em rashes cutâneos e como anticancerígeno, anti-inflamatório, antidiabético, e antidepressivo. Atualmente algumas destas propriedades tem sido atribuídas aos seus constituintes. destacando-se vários grupos de fitoquímicos, entre os quais as fisalinas, *withanolidos*, flavonóides, ácidos fenólicos e carotenóides.

Objetivo: O objetivo desta monografia foi compilar toda a informação já existente acerca dos constituintes da *physalis* e respetivas propriedades benéficas para a saúde. A nível experimental, o objetivo estende-se à identificação de alguns desses constituintes e ao estudo da capacidade antioxidante em diferentes extratos da *physalis*.

Metodologia: A pesquisa bibliográfica foi realizada utilizando palavras-chave no PubMed e B-on. Experimentalmente utilizaram-se métodos específicos para quantificação de fenóis totais, flavonóides totais e carotenóides. Para identificação de constituintes usou-se tecnologia HPLC-DAD e a capacidade antioxidante foi determinada testando o poder redutor dos extratos e a inibição dos radicais ABTS, NO• e O₂•⁻.

Resultados: A quantificação de fenóis, flavonóides e carotenóides traduziu-se em valores de concentração de 0,056mg/g, 0,032mg/g e 0,4mg/g, respetivamente. Através de HPLC-DAD foram identificados ácidos fenólicos, catequina e flavonóides. Quanto à capacidade antioxidante, o poder redutor é atingido com uma concentração de 7,35 µmoles de trolox/g no extrato metanol:água e 0,84µmoles de trolox/g para o extrato de hexano e a inibição é, respetivamente, 14,3% e 11,9% para o radical ABTS; 12,8% e 33,2% para o NO• e 13,1% e 42,4% para o O₂•⁻.

Conclusões: A bibliografia revela que *physalis* é constituída por uma quantidade significativa de fenóis, especificamente flavonóides, e carotenóides sugerindo que estes estão associados às suas inúmeras propriedades benéficas para a saúde onde se destaca a atividade antioxidante. O trabalho experimental realizado revelou resultados ao nível da sua constituição e atividade antioxidante consistentes com a literatura.

Palavras-chave: *physalis*, propriedades antioxidantes, flavonóides, carotenóides, propriedades benéficas.

ESTUDO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA PHYSALIS E REVISÃO DA SUA APLICAÇÃO NA ÁREA DA SAÚDE

Abstract

Introduction: Physalis is a diversified plant with several phytochemical groups, including physalins, withanolides, flavonoids, phenolic acids and carotenoids, which confer health benefits such as anticancer, anti-inflammatory, anti-diabetic and anti-depressant properties. In this perspective, although there are several *in vitro* and *in vivo* studies, none is carried out in humans.

Aim: The aim of this monography was to compile all existing information about physalis's constituents and respective health benefits. At the experimental level, the goal is the identification of some of these constituents and the study of physalis's antioxidant capacity.

Methodology: The literature search was performed using keywords in PubMed and B-on. In experimental terms, specific methods were used for the quantification of total phenolics, total flavonoids and carotenoids. With HPLC-DAD technology constituents were identified and evaluation of the antioxidant activity was done testing the reducing power of the extracts and inhibition of ABTS radical, NO^\bullet e $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Results: Quantification of phenols, flavonoids and carotenoids has resulted in a concentration of 0,056mg / g, 0,032mg / g and 0.4mg / g, respectively. Through HPLC-DAD method, fractions were identified as phenolic acids, flavonoids and catechins. As to the antioxidant capacity, the reducing power is achieved with a concentration 7,35 μmoles of trolox/g in water:metanol extract e 0,84 μmoles de trolox/g to hexan extract and the inhibition percentage is, respectively, 14,3% and 11,9% to free radical ABTS; 12,8% and 33,2% to NO^\bullet , 13,1% and 42,4% to $\text{O}_2^{\bullet-}$.

Conclusions: Physalis is a plant that among its many beneficial properties for health, has antioxidant activity, which is given by phenols, specifically flavonoids, and carotenoids in its constitution. However, it is necessary to explore their applications in humans.

Key-words: physalis, antioxidant properties, flavonoids, carotenoids, health benefits.

ESTUDO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DA PHYSALIS E REVISÃO DA SUA APLICAÇÃO NA ÁREA DA SAÚDE

Índice Geral

Resumo	1
Abstract	3
Índice de Figuras	7
Índice de Tabelas	9
Lista de Abreviaturas	11
Introdução	15
1. Physalis e suas características	15
1.1 Physalis peruviana.....	16
2. Compostos fitoquímicos presentes em diferentes extratos de physalis.....	17
3. Propriedades benéficas para a saúde por constituinte da “physalis”.....	23
4. Propriedades benéficas para a saúde de extratos de physalis.....	32
5. Aplicações empíricas e estudos clínicos das propriedades da physalis.....	37
Materiais, reagentes e métodos	39
1. Pesquisa bibliográfica	39
2. Reagentes e soluções.....	40
3. Aparelhagem	40
3.1.1. Balanças	40
3.1.2. Espectrofotômetro	40
3.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC).....	40
3.1.4. Água ultrapura.....	41
4. Extração de carotenoides.....	41
5. Extração de fenóis e outros fitoquímicos	41
6. Extração de flavonoides	42
7. Extração com hidrólise ácida	42
8. Determinação de fenóis totais	43
9. Determinação de flavonoides totais	43
10. Quantificação de β -caroteno.....	44
11. Condições cromatográficas para identificação de ácidos fenólicos e catequina	44
12. Condições cromatográficas para identificação de flavonoides	45
13. Poder antioxidante redutor do ferro (FRAP).....	46
14. ABTS.....	46
15. Teste do radical óxido nítrico (NO [•]).....	47
16. Teste do radical superóxido (O ₂ ^{•-}).....	48
Resultados e Discussão	49
1. Quantificação de fenóis totais	49

2. Quantificação de flavonoides totais	52
3. Quantificação de β -caroteno.....	54
4. Identificação de constituintes da physalis por HPLC-DAD.....	55
5. FRAP	63
6. ABTS.....	64
7. Teste de inibição do radical NO^{\bullet}	67
8. Teste de inibição do radical $\text{O}_2^{\bullet-}$	68
Conclusão.....	71
Referências Bibliográficas	73
Anexos	89

Índice de Figuras

Figura 1. Reta de calibração de ácido gálico para determinação da concentração de fenóis presentes no extrato metanol:água e metanólico de physalis	50
Figura 2. Reta de calibração de quercitina para determinação da concentração de flavonoides presentes no extrato metanólico de physalis	52
Figura 3. Reta de calibração de β -caroteno para determinação da concentração de carotenoides presentes no extrato de hexano de physalis	54
Figura 4. Cromatograma para detecção de catequina e ácidos fenólicos obtido com hidrólise ácida 8M a 285nm (A) e o mesmo cromatograma, mas obtido com hidrólise ácida 4M (B). Identificação dos picos (A): 1) Ácido fenólico desconhecido (8,73 min); 2) Catequina (17,95 min); 3) Ácido fenólico desconhecido (19,4 min). Identificação dos picos (B): 1') Ácido fenólico desconhecido (10,37 min); 2') Desconhecido (17,61 min); 3') Catequina (18,17 min); 4') Ácido fenólico desconhecido (19,9 min).	58
Figura 5. Cromatograma da amostra com hidrólise ácida 8M com método de separação de flavonoides. Identificação dos picos: 1) Rutina (24,96 min); 2) Flavonoide desconhecido (26,6 min); 3) Flavonoide desconhecido (29,6 min).	59
Figura 6. Obtenção de espectros de uma mistura de padrões por DAD, respetivamente a rutina (A), miricetina (B), quercitina (C) e kaempferol (D)	61
Figura 7. Reta de calibração de trolox para determinação do poder redutor do extrato aquoso e de hexano de physalis.....	63
Figura 8. Curva de calibração de trolox para determinação do poder de inibição do extrato aquoso e de hexano de physalis sobre o radical ABTS	65

Índice de Tabelas

Tabela 1. Constituintes presentes em vários extratos de partes distintas de diferentes espécies de physalis.....	18
Tabela 2. Propriedades benéficas para a saúde de alguns constituintes da physalis	24
Tabela 3. Propriedades benéficas para a saúde de extratos da physalis	33
Tabela 4. Gradiente de separação dos compostos em HPLC	45
Tabela 5. Gradiente de separação dos flavonoides em HPLC.....	45
Tabela 6. Resumo quantificação de diferentes fitoquímicos (mg/g) em extratos de physalis ...	49
Tabela 7. Relação entre as alturas dos picos cromatográficos e a concentração de catequina no padrão e na amostra sujeita a hidrólise ácida 4M.....	56
Tabela 8. Concentrações de antioxidante responsáveis pelo poder redutor e inibição de radicais pelos extratos de physalis e respectivas percentagens de inibição.....	62

Lista de Abreviaturas

A β : Proteína beta-amiloide

ABTS: 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)

ACC: Acetil-CoA carboxilase

Akt: Proteína cinase B

ALT: Alanina aminotransferase

AMPK: Proteína cinase adenosina monofosfato

AST: Aspartato aminotransferase

Bcl-2: Células B-2 de linfoma

CAT: Catalase

CCl₄: Tetracloroeto de carbono

Con-A: Concanavalina-A

COX-2: Cicloxigenase 2

CPT-1: Carnitina palmitoiltransferase

DAD: Detetor Diode Array

DNA: Ácido desoxirribonucleico

FeCl₃.6H₂O: cloreto de ferro hexa-hidratado

FOXO1: Promotor "Forkhead" 1

FRAP: Poder antioxidante redutor do ferro

FTIR: Espetroscopia de infravermelhos por transformada de Fourier

GC: Cromatografia gasosa

G6Pase: Glucose-6-fosfatase

GHS: Glutationa

GHS-Px: Glutationa peroxidase

GLUT4: Transportador de glucose 4

HCl: Ácido clorídrico

HDL: Lipoproteína de alta densidade

HHPE: Extração assistida por alta pressão hidrostática

HIF-1 α : Fator induzido por hipoxia alfa 1

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

HS-SPME: Microextração de fase sólida "headspace"

HSP32: Proteína de choque térmico 32

IC50: Concentração de antioxidante capaz de inibir o radical em 50%

ICAM-1: Molécula de adesão celular 1

IFN- γ : Interferão gama

IL-1 β : Interleucina-1 beta

IL-2: Interleucina-2

IL-4: Interleucina-4

IL-6: Interleucina-6

IL-10: Interleucina-10

iNOS: Óxido nítrico sintetase

LDL: Lipoproteína de baixa densidade

LPS: Lipopolissacarídeo

MAP2: Proteína associada ao microtúbulo 2

MAPK: Proteína cinase ativada por mitogénio

MCP-1: Proteína quimiotáctica de monócito 1

MDA: Malondialdeído

MPO: Mieloperoxidase

MS: Espectrofotometria de massa

MRGPC11: Recetor C11 com proteína G acoplada

Na₂CO₃: Carbonato de cálcio

NADH: Nicotinamida adenina dinucleótido

NBT: Nitrocloreto de tetrazolium azul

NED: N-(1-naftil) etilenodiamina dicloridrato

NF- κ B: Fator nuclear kappa beta

NF-H: Neurofilamento H

NO \bullet : Óxido nítrico

NP-HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência de fase normal

O₂ \bullet^- : Radical superóxido

PAR-2: Protéase 2

PARP: Poli (ADP-ribose) polimerase

PBS: Tampão fosfato salino

- PEPCK: Fosfoenolpiruvato carboxicinase
- PGI₂: Prostaglandina I₂
- PMS: Metossulfato de fenazina
- PPAR α : Recetor proliferador alfa ativado de peroxisoma
- PPAR- γ : Recetor proliferador gama ativado de peroxisoma
- SOD: Superóxido dismutase
- SREBP-1c: Proteína reguladora de esteroides 1c
- STAT1: Gene transdutor de sinal e ativador da transcrição 1
- T4: Tiroxina
- TLC: Cromatografia em camada fina
- TNF- α : Fator necrosante tumoral alfa
- TPTZ: 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina
- Trolox: 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico
- TXA₂: Tromboxano A₂
- UPLC: Cromatografia líquida de ultra performance
- UVB: Radiação ultravioleta B
- VCAM-1: Molécula de adesão vascular 1

Introdução

A presente monografia tem como intuito apresentar o estado da arte relativamente às aplicações da *physalis* na saúde, numa primeira parte, e demonstrar as suas propriedades antioxidantes *in vitro*, referenciando os seus constituintes, numa segunda.

O primeiro capítulo pretende resumir a origem etnobotânica da *physalis*, bem como a sua constituição em termos de macronutrientes, remontando assim ao motivo das suas utilizações mais arcaicas.

Segue-se o segundo capítulo, cujo objetivo é de mostrar a panóplia de constituintes já identificados em diversos extratos de *physalis*, para no terceiro e quarto capítulos referenciar os benefícios desses constituintes e do próprio fruto, respetivamente, ao nível da saúde. Na sequência dos benefícios para a saúde, o quinto capítulo pretende mostrar a utilização empírica da planta e os escassos ensaios clínicos já existentes.

Em termos de trabalho experimental, a metodologia procura ir ao encontro do que refere a pesquisa bibliográfica, pelo que se procurou identificar alguns dos constituintes, quantificar grupos de fitoquímicos presentes na *physalis* e determinar a sua capacidade antioxidante.

Após a apresentação dos resultados e discussão dos mesmos, termina-se esta monografia com as conclusões que relacionam o trabalho experimental com a evidência da literatura.

1. *Physalis e suas características*

Desde há vários anos que a *physalis* possui várias utilizações, sendo exemplo disso os nativos de Madhupur, no Bangladesh, que utilizam esta planta para a epigastralgia, para rashes cutâneos e como analgésico (Islam et al., 2014).

Os indígenas desta região preparam soluções a partir das folhas e óleos provenientes da baga ou pastas, que necessitam de várias partes da planta e que se obtêm pela emulsão de óleos como o de cocô e o de mostarda, com intuito terapêutico (Islam et al., 2014).

São estas propriedades dadas por características conhecidas da baga da *physalis* que fazem com que esta seja uma fruta de interesse não só comercial, mas também do ponto de vista dos benefícios para a saúde (Yildiz, Izli, Unal & Uylaser, 2015).

Exemplo disso é o cálice de *Physalis alkekengi* var. *franchetii*, que tem sido vastamente utilizado na medicina tradicional chinesa, pois sendo uma espécie que sobeja no país, é também uma fonte de esteroides muito importante para o organismo humano (Ji et al., 2012).

Contrariamente, os europeus apenas utilizam a *physalis* como uma boa combinação com chocolate ou como elemento decorativo em sobremesas, o que revela pouco investimento na pesquisa das suas propriedades (Ramadan & Morsel, 2003).

Desta forma, os interesses na *physalis* reportam sobretudo às suas características químicas: 18,67% é matéria seca, 14,17% são compostos solúveis em água, 2,98% são cinzas, 1,66% é proteína, 0,18% são lípidos e 13,86% são hidratos de carbono (Yildiz et al, 2015).

Para além disso, pode ser utilizada como uma fonte de obtenção de óleo, muito mais saudável que os de origem animal e rico em ácidos gordos essenciais, fitoesteróis, carotenos e vitaminas lipossolúveis (Ramadan & Morsel, 2003).

1.1 *Physalis peruviana*

A *physalis* é uma planta que se encontra classificada, em termos botânicos, dentro da família Solanaceae, no género *Physalis*, e cuja espécie é *P.peruviana* Linnaeus (Cedeño & Montenegro, 2004).

Dentro desta espécie existem cerca de 80 variações que partilham a mesma estrutura: o cálice envolve toda a fruta durante todo o seu desenvolvimento, tendo como função proteger a planta de ataques externos por parte de insetos, condições climatéricas e doenças provocadas por vírus (Cedeño & Montenegro, 2004).

A origem da *physalis* remonta aos tempos da civilização Inca, pelo que a planta é oriunda dos Andes, tendo depois surgido em vários outros locais da América latina. Desde essa altura que não se registam alterações estruturais da planta (Puente, Pinto-Muñoz, Castro & Cortés, 2011).

No entanto, as condições para o seu desenvolvimento são exigentes. A *physalis* necessita de temperaturas amenas, caso contrário ocorrerão problemas no processo de floração e amadurecimento. Do mesmo modo, a planta requer condições de grande exposição à luz e reduzida exposição ao vento (Tapia & Fries, 2007).

No que respeita ao fornecimento de água, este deve ser mais acentuado no período inicial de desenvolvimento do fruto, perdendo a sua relevância na fase de maturação (Tapia & Fries, 2007).

Quanto aos tipos de *physalis*, a *physalis* colombiana distingue-se da africana devido à cor intensa exibida pelo fruto e às menores quantidades de polissacarídeos nele presentes. Esta fruta apresenta também uma dimensão mais reduzida, com um peso médio de 5 gramas. Devido às características apresentadas, esta variedade é mais procurada e explorada em termos de mercado do que as restantes (Fischer, Almanza-Merchán e Miranda 2014).

2. Compostos fitoquímicos presentes em diferentes extratos de *physalis*

Ao longo do tempo foram sendo realizados vários estudos com o intuito de identificar compostos que contribuem para as várias atividades farmacológicas que a *Physalis sp.* apresenta.

Na Tabela 1 estão apresentados alguns desses estudos, que identificam diferentes moléculas em extrações realizadas com diversos solventes, tendo em conta a parte da planta que foi utilizada na extração.

Tabela 1. Constituintes presentes em vários extratos de partes distintas de diferentes espécies de *physalis*

Autores	Espécie	Parte da planta	Solvente extrator	Método	Constituintes
Angamuthu, Ganapathy, Evanjelene, Ayyavuv & Padamanabham (2014)	<i>Physalis minima</i>	Fruto	Metanol	Teste com acetato de chumbo, teste com ácido sulfúrico, teste de Burchard, adição de água destilada ao extrato e adição de cloreto de ferro	Flavonóides, esteroides, saponinas e taninos
Angamuthu et al. (2014)	<i>Physalis minima</i>	Fruto	Acetato etílico	Teste de Mayer, teste com ácido sulfúrico e teste de Borntrager	Alcalóides, flavonoides e antraquinonas
Angamuthu et al. (2014)	<i>Physalis minima</i>	Fruto	Éter dietílico	Teste de Mayer, teste de Burchard, teste de Salkowski, teste com cloreto de ferro e adição de água destilada ao extrato	Alcalóides, esteroides, terpenoides, fenóis e saponinas
Briones-Labarca, Giovagnoli-Vicuña, Figueroa-Alvarez, Quispe-Fuentes & Pérez-Won (2013)	<i>Physalis peruviana</i>	Fruto	Ácido metafosfórico	HPLC e HHPE	Ácido ascórbico (26.31mg/100g)
Briones-Labarca et al. (2013)	<i>Physalis peruviana</i>	Fruto	Hexano:acetona:etanol (50:25:25, v/v)	HPLC e HHPE	β -caroteno (1074,67mg/100g)
Gautam, Dewivedi & Kumar (2015)	<i>Physalis peruviana</i>	Fruto	Água Metanol Etanol	FTIR	<i>Withanolidos</i>
Huang et al. (2014)	<i>Physalis peruviana</i>	Cálice	Metanol e éter de petróleo	LC-MS/MS	Fisalina A, fisalina D, fisalina L, fisalina R, fisalina X e diversos fragmentos das mesmas
Ji et al. (2012)	<i>Physalis alkekengi</i> var. <i>franchetii</i>	Cálice	Etanol	UPLC-MS/MS	Fisalina A, isofisalina A, fisalina O, fisalina L e fisalina G
Licodiedoff, Koslowski & Ribani. (2013)	<i>Physalis peruviana</i>	Fruto com cálice	Metanol/Água	HPLC	Rutina (78.64 μ g/100g), miricetina (6.59 μ g/100g) e <i>kaempferol</i> (11.57 μ g/100g)

Autores	Espécie	Parte da planta	Solvente extrator	Método	Constituintes
Maobe, Gitu, Gatebe & Rotich (2012)	<i>Physalis peruviana</i>	Folhas	Hexano, diclorometano, acetato etílico e etanol	TLC	6-dihidroxi-flavona, 3-hidroxi-flavona, morina, ácido <i>p</i> -cumárico, ácido cafeico e apigenina
Namiesnik et al. (2014)	<i>Physalis peruviana</i>	Fruto	Metanol/água (1:1)	Espectrofotometria UV-visível	Polifenóis (6.24-3.77mg/ GAE g), flavonoides (0.29-0.45mg/CE g) e taninos (1.01-1.24mg/CE g)
Nathiya & Dorcus (2012)	<i>Physalis minima</i>	Caule, folhas e fruto	Clorofórmio, éter dietílico, etanol, acetato etílico e metanol	Teste de Mayer, teste de Dragendorff, teste de Borntrager, teste de hidróxido de sódio, teste de espuma, teste de Burchard, teste de iodina, teste da gelatina e teste de Salkowski	Alcaloides, flavonoides, fenóis, quininas, saponinas, esteroides, taninos e terpenoides
Radaman & Morsel (2003)	<i>Physalis peruviana</i>	Polpa	Isoctano/2-propanol (99:1 v/v)	NP-HPLC	Vitamina E (8.6% dos lípidos totais), β-caroteno (0.32% dos lípidos totais)
Radaman & Morsel (2003)	<i>Physalis peruviana</i>	Fruto	Isoctano/2-propanol (99:1 v/v)	NP-HPLC	Vitamina E (3.2% dos lípidos totais), β-caroteno (0.22% dos lípidos totais)
Radaman & Morsel (2003)	<i>Physalis peruviana</i>	Semente	Isoctano/2-propanol (99:1 v/v)	NP-HPLC	Vitamina E (2.9% dos lípidos totais), β-caroteno (0.13% dos lípidos totais)
Radaman & Morsel (2004)	<i>Physalis peruviana</i>	Polpa	-	-	Carotenos (1.6mg/100g), tiamina (0.1mg/100g), riboflavina (0,03mg/100g), niacina (1.70mg/100g) e ácido ascórbico (43mg/100g)
Rop, Micek, Jurikova & Valsikova (2012)	<i>Physalis peruviana</i>	Fruto	Metanol	Espectrofotometria UV-visível, Cromatografia	Fenóis (7.62g GAE/Kg), flavonoides (4.76g/Kg), ácido ascórbico (0.97g/Kg)
Rosso & Mercadante (2007)	<i>Physalis angulata</i>	Fruto	Metanol	HPLC-DAD-MS/MS	trans β-caroteno (76.8%), 9-cis-β-caroteno (3.6%) e trans α-criptoxantina (3.4%)
Sathyadevi & Subramanian (2015)	<i>Physalis peruviana</i>	Fruto	Etanol	Espectrofotometria UV-visível, HPLC-DAD	Fenóis (76.84mg/g de massa seca), flavonoides (241mg/g de massa seca), rutina, quercitina, miricetina e <i>kaempferol</i>
Usaizan, Abdullah, Ahmad & Saleh (2014)	<i>Physalis minima</i>	Folha	Etanol	GC-MS	Acetamida, 2,2,2-trifluoro-N-metil (7.2%); ciclopentan-1-ona; 2-metil (3,83%); fitol (17.88%); ácido n-hexadecanóico (29.81%); ácido octadecadienóico (5.04%); ácido oleico (3.55%); éter monododecil hexaetilenoglicol (5.6%) e ácido 9,12,15-octadecatrienóico (14.63%)

Autores	Espécie	Parte da planta	Solvente extrator	Método	Constituintes
Usaizan et al. (2014)	<i>Physalis minima</i>	Ramos	Etanol	GC-MS	Ácido hexadecanóico (4.06%); 2-[2-[2-[2-[2-[2-(2-hidroxietoxi)etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etoxi]etanol (1.43%), O-Metil-DL-serina, N-dimetilaminometileno-éster etílico (63.20%) e etilo dl-(1-naftil)glicolato (4.94%)
Usaizan et al. (2014)	<i>Physalis minima</i>	Fruto	Etanol	GC-MS	Acetamida, 2,2,2-trifluoro-N-metil (3.90%); 4H-pirran-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil- (8.40%); 5-Hidroximetilfurfural (14.07%), ácido (Z)-3-fenil-2-propanóico (3.33%), ácido n-Hexadecanóico (28.98%), ácido octadecanóico (3.35%), ácido octadeca-9-enóico (9.15%); ácido 9,12-Octadecadienóico (Z,Z)- (16.09%)
Xu, Ju., Guan, Xu e Wang, (2012)	<i>Physalis alkekengi</i> L. var <i>franchetti</i>	Cálice	Carbinol	HPLC	Luteolósido, luteolina, fisalina A, fisalina P e fisalina O
Yilmaztekin (2014)	<i>Physalis peruviana</i>	Fruto	Polipropileno	HS-SPME GC-MS	Álcoois (39.27%) – 1-hexanol, eucaliptol e 4-terpineol; ésteres (38.52%) – butanoato de etilo, octanoato de etilo e decanoato de etilo; terpenos (7.31%) – α -terpinoleno, β -mirceno e cimeneno; aldeídos (7.05%) – benzaldeído, hexanal e β -ciclocitral; cetonas (3.97%) – 2-pentanona; lactonas (2.09%) – γ -hexalactona e ácidos (0.90%)
Zawawy (2015)	<i>Physalis peruviana</i>	Pele	Etanol	Colorimetria e espectrofotometria UV-visível	Saponinas (0.34mg/g), carotenoides (0.09mg/g), fenóis (166.25mg/g), flavonoides (0.64mg/g) e taninos (55.6mg/g)
Zheng, Luan, Chen, Ren e Wu (2012)	<i>Physalis alkekengi</i> L. var <i>franchetti</i>	Fruto em pó	Metanol	UPLC-MS-DAD	Fisalina A, fisalina B, fisalina C, fisalina D, fisalina D, fisalina G, fisalina L, fisalina M, fisalina O, fisalina R, isofisalina B, ácido ferúlico, cafeato de etilo, esculetina; 2,6-dimetoxi-4-(hidroximetil)-benzaldeído e 1-hidroxi- α -ciperona

Mediante os estudos apresentados na Tabela 1 podemos constatar que existe uma certa diferença nos constituintes, e respectivas quantidades, recolhidos em função dos solventes utilizados.

Independentemente do solvente utilizado na extração, foram largamente detetados alcalóides, flavonoides, fenóis, esteroides, saponinas, taninos, e terpenóides (Angamuthu et al., 2014; Licodiedoff et al., 2013; Namiesnik et al., 2014; Nathiya & Dorcus, 2012; Rop et al., 2012; Zawawy, 2015)

No entanto, o estudo de Nathiya & Dorcus (2012) constatou que os fenóis foram fracamente removidos pelos solventes orgânicos.

O maior número de constituintes extraídos verificou-se com os extratos de hexano (3), acetato de etilo (4), diclorometano e etanol (3), no estudo realizado por Maobe et al (2012).

Já Angamuthu et al. (2014) detetaram as maiores concentrações de fitoquímicos em extrato metanólico e em éter dietílico.

Contudo, foi também já verificado que os mesmos compostos são extraídos em solventes como o etanol, incluindo os *withanólidos* (Gautam et al., 2015) e é também o etanol o responsável pela recolha dos produtos mais voláteis, como alguns álcoois, cetonas e benzaldeídos. (Usaizan et al., 2014)

Em termos de abundância, tanto o extrato metanólico como o extrato em éter dietílico apresentam a maior capacidade de extração de compostos como os alcalóides, flavonoides, esteróides, terpenóides, fenóis, saponinas e taninos. Já os extratos em acetato de etilo revelam a presença de antraquinonas e saponinas (Angamuthu et al., 2014).

No entanto, os flavonoides que são os fitoquímicos em maior quantidade, têm a sua extração comprometida com acetona, sendo esta favorecida pelo metanol (Licodiedoff et al., 2013).

No que respeita às partes que constituem a planta, o fruto apresenta a maior abundância de constituintes, destacando-se os fenóis e flavonoides (Angamuthu et al., 2014; Rop et al., 2012; Sathyadevi & Subramanian, 2015), vitamina E (Radaman & Morsel, 2003), β -caroteno (Briones-Labarca et al., 2013; Radaman & Morsel, 2003; Rosso & Mercadante, 2007) e ácido ascórbico (Briones-Labarca et al., 2013; Radaman & Morsel, 2004; Rop et al., 2012).

Tanto a vitamina E como o β -caroteno têm vindo a ser referenciados como responsáveis por grande parte das propriedades farmacológicas da *physalis* (Hassanien, 2011).

Com a ajuda do HPLC-DAD-MS/MS, verificou-se que o trans- β -caroteno é o carotenoide mais abundante, contribuindo em 76,8% para a capacidade antioxidante dos carotenoides existentes na *physalis* (Hassanien, 2011). A extração do β -caroteno parece estar facilitada pela mistura de solventes orgânicos, enquanto o ácido ascórbico é eficazmente extraído pelo ácido metafosfórico (Briones-Labarca et al., 2013).

Por outro lado, destaca-se também o cálice por ser o principal depósito das fisalinas (Huang et al., 2014; Ji et al., 2012; Xu et al., 2012), que são moléculas exclusivas da *physalis* e que podem apresentar menor estabilidade, como as fisalinas O e P, ou maior, como a fisalina A, mediante as condições de conservação. Do mesmo modo, as concentrações na planta também são variáveis, sendo a fisalina A a mais abundante (Xu et al. 2012).

Já foram descobertas várias fisalinas, sendo a mais recente a fisalina X (Huang et al., 2014) e também já foram identificadas as isofisalinas (Jin et al., 2012).

Por fim, começam também a surgir estudos que identificam os *withanolidos* como moléculas únicas da *physalis*, extraídos pelo etanol, cuja atividade antitumoral, imunossupressora e heptatoprotetora tem vindo a ser estudada. (Gautam et al., 2015)

Em suma, a *physalis* é uma planta ainda pouco estudada no que diz respeito à variedade de constituintes que contém, daí a necessidade de se utilizarem diferentes extratos para melhor identificação dessas moléculas. Contudo, será sempre pertinente que se pesquisem

os constituintes presentes no extrato aquoso, uma vez que a água é o único solvente passível de ser consumido pelos humanos.

3. *Propriedades benéficas para a saúde por constituinte da “physalis”*

Na Tabela 2 estão reunidos estudos das propriedades benéficas de constituintes identificados em diferentes extratos de *physalis*, como referenciados no capítulo anterior, sendo estes os mais proeminentes na quantidade e diversidade de propriedades que apresentam.

As referências bibliográficas apresentadas apenas contêm informação recolhida de experiências efetuadas com ratos ou linhagens celulares, pois com exceção do β -caroteno, não foram encontrados estudos com amostra constituída por humanos.

De um modo geral, todos os constituintes apresentados na Tabela 2 revelam por si só que a *Physalis peruviana* é uma planta com propriedades variadas e que por este motivo poderá interferir com diferentes áreas de intervenção terapêutica.

No que respeita a cada constituinte, as fisalinas são as mais consistentes com as propriedades apresentadas, seguidas dos *withanolidos* e da catequina. Já o β -caroteno, os ácidos fenólicos e os flavonoides são mais multifacetados, apresentando propriedades referentes a várias áreas da saúde.

No entanto, com mais pormenor, analisa-se de seguida as propriedades de cada constituinte individualmente.

Tabela 2. Propriedades benéficas para a saúde de alguns constituintes da *physalis*

Autores	Constituinte	Amostra	Efeito benéfico para a saúde	Mecanismo de ação
Lima et al. (2014)	Fisalinas B, D F e G	Ratos suíços Webster	Efeito antinociceptivo	Bloqueio da transmissão neuronal do sinal da dor por inibição de nociceptores a nível supra-espinhoso e não a nível periférico
Silva, Simas, Batista, Cardarelli & Tomassini (2005)	Fisalina B	<i>N. gonorrhoeae</i> ATCC49226, <i>S. aureus</i> ATCC 29213, <i>S. aureus</i> ATCC 25923, <i>S. aureus</i> ATCC 6538P	Atividade antimicrobiana (bactericida)	-
Vandenberghe et al. (2008)	Fisalina B	Células cancerígenas de colon humano DLD-1	Anticancerígena	Inibição do complexo ubiquitina-proteassoma em células cancerígenas DLD-1 por indução da produção da proteína NOXA, causando a apoptose das células DLD-1
Ma, Han, Hu & Zhou (2015)	Fisalina B	Células cancerígenas do cólon HCT116	Anticancerígena	Indução da apoptose por aumento de produção de espécies reativas de oxigénio na mitocôndria da célula e por alteração do promotor Beclin 1 e dos microfilamentos de actina necessários à formação de autofagossomas e lisossomas
Ooi, Muhammad & Sulaiman (2013)	Fisalina F	Células de carcinoma da mama T-47D	Anticancerígena	Indução da apoptose das células T-47D por sobreexpressão dos genes apoptóticos c-myc e caspase-3, causando a fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA)
He et al. (2013)	Fisalina A	Células de fibrossarcoma humano HT1080	Anticancerígena	Indução da apoptose celular por sobreexpressão de caspase-3 e caspase-8, responsáveis pela clivagem de proteínas importantes na reparação de DNA
Pinto et al. (2010)	Fisalina E	Ratos suíços	Anti-inflamatório (Redução dos mediadores inflamatórios na pele na presença em condições como a dermatite crónica)	Redução dos níveis de fator necrosante tumoral alfa (TNF- α), fator nuclear kappa beta (NF-kB), interferão gama (IFN- γ) e da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO)

Autores	Constituinte	Amostra	Efeito benéfico para a saúde	Mecanismo de ação
Csepanyi et al. (2015)	β -caroteno	Ratazanas macho	Protetor cardiovascular	Diminuição do tempo de reperfusão das células cardíacas em caso de isquemia, possivelmente por aumento da enzima hemeoxigenase 1 que impede a morte celular
El-Demerdash, Yousef, Kedwany & Baghdadi (2004)	β -caroteno	Ratazanas Sprague-Dawley	Hepatoprotetor e neuroprotetor	Neutralização dos radicais livres que se formam na presença de cádmio, regularizando os níveis de transaminases e outras proteínas
Sarada et al. (2002)	β -caroteno	Ratos albinos	Reversão dos efeitos da hipoxia	Redução de malondialdeído (MDA) no sangue, que tem como consequência o aumento dos níveis sanguíneos de glutathione (GSH) e glutathione peroxidase (GSH-Px), minimizando o stress oxidativo
Zornoff et al. (2006)	β -caroteno	Ratos Wistar	Protetor cardiovascular	Impede a hipertrofia cardíaca nos fumadores por manutenção da estrutura dos microfilamentos e de todo o sarcoma, uma vez que leva à redução do stress oxidativo
Eliassen et al. (2015)	β -caroteno	Mulheres sem cancro monitorizadas por um período de 20 anos	Anticancerígeno (Diminuição significativa da probabilidade de desenvolvimento de cancro da mama durante os primeiros 3 anos)	-
Kasperczyk et al. (2014)	β -caroteno	Trabalhadores expostos ao chumbo com ingestão de 10mg/dia durante 12 semanas	Antistress (Redução do stress oxidativo causado pela exposição permanente ao chumbo)	Diminuição dos níveis de MDA e lipofuscina; aumento dos níveis de GSH; redução da atividade da GSH-Px e aumento da atividade da glucose-6-fosfato desidrogenase e da catalase (CAT)
Jung et al. (2014)	Catequina	Ratos carecas SKH-1	Proteção da pele contra as radiações Ultravioleta B (UVB)	Impede a diminuição dos níveis de ácidos gordos e hidratos de carbono causada pela radiação UVB e impede o aumento de ceramidas e outros compostos orgânicos, que culmina na desidratação da pele, eritema e rutura das fibras de colagénio
Shahid et al. (2016)	Catequina	Ratos suíços albinos	Anti-inflamatória	Impede o aumento de NF-kB, TNF- α , interleucina-6 (IL-6) e ciclooxigenase 2 (COX-2) causado pelo benzopireno no tecido pulmonar

Autores	Constituinte	Amostra	Efeito benéfico para a saúde	Mecanismo de ação
Shahid et al. (2016)	Catequina	Ratos suíços albinos	Anticancerígena	Inibição da ação do benzopireno sobre o tecido pulmonar, impedindo o decréscimo da proteína p53, caspase-3 e aumento células B de linfoma (Bcl-2), todos eles responsáveis por indução de apoptose
Shahid et al. (2016)	Catequina	Ratos suíços albinos	Antioxidante	Impede a conjugação da glutatona com um metabolito tóxico de benzopireno pela GHS-Px e impede a diminuição da atividade das enzimas CAT e superóxido dismutase (SOD)
Tsai & Chen (2016)	Catequina	Células cancerígenas da próstata PC-3	Anticancerígena	Paragem do ciclo celular na fase S por aumento da expressão da proteína P27 e diminuição da expressão de várias ciclinas. Indução da apoptose por diminuição de bcl-2 e aumento de caspase-3,8 e 9
Wein, Schrader, Rimbach & Wolfram (2013)	Catequina	Ratos db/db (fêmea)	Anti-inflamatória e hipoglicemiante	Inibe a libertação de moléculas solúveis de adesão celular envolvidas nos processos inflamatórios do endotélio vascular e diminui os níveis de glucose no sangue em jejum por estímulo da produção de insulina
Kour et al. (2009)	<i>Withanolidos</i>	Ratos suíços albinos	Antistress	Reverte a inibição de linfócitos T em situações de stress crónico, aumentando os níveis de interleucina-2 (IL-2) e de IFN- γ e consequentemente diminui os níveis de cortisol no sangue
Kuboyama, Thoda & Komatsu (2005)	<i>Withanolidos</i>	Embriões de ratos Sprague-Dawley	Reversão de atrofia neuronal, recuperação de sinapse e recuperação da memória	Estimulação da transdução do sinal em vias neuronais por aumento da proteína associada ao microtúbulo 2 (MAP2) e do neurofilamento-H (NF-H)
Panda & Kar (1999)	<i>Withanolidos</i>	Ratos suíços albinos	Tirotrópico	Aumento da produção de tiroxina (T4) pela glândula tiroideia
Hattiwale et al. (2013)	Ácido ascórbico	Ratos Wistar	Antistress	Impedimento da elevação da atividade da óxido nítrico sintetase (iNOS) na presença de níquel e consequentemente diminui os níveis de óxido nítrico (NO) no sangue, cérebro e pulmões
Kawada et al. (2013)	Ácido ascórbico	Células leucémicas humanas K562, HL60, MOLM14, NB4, Jurkat e Raji	Anticancerígeno	Indução da apoptose nas células leucémicas por aumento da produção de peróxido de hidrogénio e por diminuição da angiogenese, reprimindo a transcrição do fator induzido por hipoxia alfa 1 (HIF-1 α)

Autores	Constituinte	Amostra	Efeito benéfico para a saúde	Mecanismo de ação
Moretti et al. (2013)	Ácido ascórbico	Ratos suíços (fêmea)	Antistress e antioxidante	Redução da peroxidação lipídica e controla os níveis de atividade da superóxido dismutase (SOD), glutatona redutase e GHS-Px
Rosa, Neis, Ribeiro, Moretti & Rodrigues (2016)	Ácido ascórbico	Ratos suíços (fêmea)	Antidepressivo	Ativação de recetores GABA _A e inibição de recetores GABA _B
Narasimhan, Chinnaiyan & Karundevi (2015)	Ácidos fenólicos (ácido ferrúlico)	Ratos Wistar	Antidiabético	Redução da interação entre o promotor “Forkhead” 1 (FOXO1) e os genes promotores da neoglicogénese fosfoenolpiruvado carboxicinase (PEPCK) e Glucose-6-fosfatase (G6Pase) e aumenta os níveis de glicogénio sintetase e da glucocinase
Yan et al. (2013)	Ácidos fenólicos (ácido ferrúlico)	Ratos fêmea APP/PS1	Adjuvante na doença de Alzheimer	Redução dos níveis de deposição de proteína beta-amiloide (A β) e de interleucina -1 beta (IL-1 β) no córtex frontal
Pradhananga & Shim (2015)	Ácidos fenólicos (ácido cafeico)	Células HEK293T, HeLa e do gânglio dorsal de ratos	Antipruriginoso	Redução dos níveis de cálcio intracelular necessários para a libertação de histamina e inibe duas vias responsáveis pelo prurido causado pelo péptido similar à histamina SLIGRL-NH ₂ : recetores ativados pela protease 2 (PAR-2) e recetor C11 com proteína G acoplada (MRGPRC11)
Zhang et al. (2014)	Ácidos fenólicos (ácido cafeico)	Ratos BALB/c	Anti-inflamatório	Redução da expressão de TNF- α , IL-6, IL-1 β e NF-kB nos queratinócitos
Pragasam, Venkatesan & Rasool (2013)	Ácidos fenólicos (ácido cumárico)	Ratos Wistar	Anti-inflamatório e imunomodulador	Diminuição da produção de TNF- α e o número de macrófagos em circulação no líquido sinovial, bem como os complexos autoimunes formados em circulação
Yoon et al. (2013)	Ácidos fenólicos (ácido cumárico)	Células musculares L6 de rato	Regulador do metabolismo da glucose	Indução da fosforilação de proteína cinase adenosina monofosfato ativada (AMPK) e da acetil-coA carboxilase (ACC)

Autores	Constituinte	Amostra	Efeito benéfico para a saúde	Mecanismo de ação
Yoon et al. (2013)	Ácidos fenólicos (ácido cumárico)	Células musculares L6 de rato	Antidislipídico	Estimulação da expressão dos genes que codificam a carnitina palmitoiltransferase 1 (CPT-1) e o recetor proliferador alfa ativado de peroxisoma (PPAR α)
Kumar, Jayanand, Perween, Ansari & Rai (2014)	Rutina	Células de glioma cerebral BMG-1	Neuroprotetora	Normalização da morfologia celular por inibição do peróxido de hidrogénio, conservando a estrutura do DNA e aumentando os níveis de GHS
Richetti et al. (2011)	Rutina e quercitina	Peixe-zebra	Redutoras da perda de memória	-
Schwengel et al. (2014)	Rutina	Ratos BALB/c	Hepatoprotetora e neuroprotetora	Redução dos níveis do proto-oncogene c-Fos a nível da medula espinal e da formação de anticorpos para a caspase-3 no fígado
Schwengel et al. (2014)	Quercitina	Ratos BALB/c	Hepatoprotetora e neuroprotetora	Redução dos níveis do proto-oncogene c-Fos a nível da medula espinal, redução da formação de anticorpos para a caspase-3 no fígado e diminuição da migração de macrófagos
Angst et al. (2013)	Quercitina	Células MIA PaCa-2 (carcinoma do pâncreas)	Anticancerígena	Indução da apoptose possivelmente por ativação de AMPK e inibição de NF-kB
Du et al. (2010)	Quercitina	Ratos BALB/c e células cancerígenas da mama 4T1	Anticancerígena	Indução da apoptose por aumento dos níveis de IFN- γ e IL-2 e diminuição dos níveis de IL-4 e IL-10. Estimulação de linfócitos T CD8 ⁺ contra as células cancerígenas
Guo et al. (2015)	Miricetina	Ratos Kunming	Protetora do endotélio vascular	Estimulação da síntese de óxido nítrico (NO) no endotélio, redução dos níveis de tromboxano A2 (TXA ₂) e aumento dos níveis de prostaglandina I ₂ (PGI ₂), de SOD e de glutathiona peroxidase (GSH-Px)
Zang et al. (2014)	Miricetina	Células de carcinoma do esófago EC9706 e KYSE30	Anticancerígena	Indução de apoptose por ligação ao N-terminal da cinase 2 ribossomal S6 (RSK2) e ao Bad. Inibição da proliferação celular por ligação ao <i>checkpoint</i> mitótico Mad1.
Zhao, Hong, Dong, Meng & Mu (2012)	Miricetina	Ratos BALB/c	Anticolítica e antiulcerosa	Diminuição da produção de NO, MPO, MDA e aumento de SOD e GSH-Px. Estimulação da produção de IL-1 β e IL-6

Autores	Constituinte	Amostra	Efeito benéfico para a saúde	Mecanismo de ação
Alkhalidy et al. (2015)	<i>Kaempferol</i>	Ratos C57BL/6J	Antidiabético (Preservação das células β do pâncreas por diminuição da resistência periférica à insulina, síntese de glicogénio e lipólise)	Favorecimento da produção de AMPK nas células musculares e da expressão do transportador de glucose 4 (GLUT4) para o músculo
Kong, Luo, Li, Zhou & He (2013)	<i>Kaempferol</i>	Coelhos brancos da Nova Zelândia	Anti-inflamatório e antiaterosclerótico (Inibição da expressão de genes e mediadores inflamatórios na aorta)	Diminuição dos níveis de TNF- α , IL-1 β e MDA, acompanhado da subexpressão dos genes de selectina E, molécula de adesão intracelular 1 (ICAM-1), molécula de adesão vascular 1 (VCAM-1) e proteína quimiotáctica de monócito 1 (MCP-1)
Zang, Zhang, Igarashi & Yu (2015)	<i>Kaempferol</i>	Ratos C57BL/6J	Promotor da diminuição de peso e antidiabético (Diminuição dos níveis sanguíneos de glucose em jejum, hemoglobina A1c (HbA1c) e resistência à insulina)	Aumento do metabolismo lipídico por diminuição da expressão de recetor proliferador ativado de peroxisoma (PPAR- γ) e proteína reguladora de esteroides 1c (SREBP-1c)

Como referido anteriormente, as fisalinas apresentam um padrão consistente das suas propriedades. As fisalinas apresentam sobretudo propriedades anticancerígenas (He et al., 2013; Ma, Han, Hu & Zhou, 2015; Ooi, Muhammad & Sulaiman, 2013; Vandenberghe et al., 2008), embora já existam estudos que descrevam as suas propriedades antimicrobiana (Silva, Simas, Batista, Cardarelli & Tomassini, 2005), antinociceptiva (Lima et al., 2012) e anti-inflamatória (Pinto et al., 2010).

Contudo, os mecanismos de ação pelos quais as fisalinas atuam sobre o cancro diferem entre si. A sua atividade centra-se sobretudo na regulação da expressão de genes envolvidos na apoptose (He et al., 2013; Ooi, Muhammad & Sulaiman, 2013) ou na estimulação de promotores e enzimas para esse mesmo fim (Ma, Han, Hu & Zhou, 2015; Vandenberghe et al., 2008).

No caso do β -caroteno, as propriedades ligeiramente mais variadas, embora o mecanismo base se relacione sempre com o stress oxidativo. Esta molécula tem mostrado um elevado efeito protetor a nível cardiovascular, devido às suas propriedades antioxidantes (Csepanyi et al., 2015; Kasperczyk et al., 2014; Sarada et al., 2002; Zornoff et al., 2006), mas também devido à sua influência sobre as enzimas que neutralizam os radicais livres, exerce um efeito hépato e neuroprotetor (El-Demerdash et al., 2004).

Os estudos realizados em humanos comprovam não só as propriedades antioxidantes do β -caroteno como forma de combate a tóxicos externos (Kasperczyk et al., 2014), mas também como protetor para o cancro (Eliassen et al., 2015).

Também as propriedades benéficas da catequina assentam maioritariamente em mecanismos genéticos (Shahid et al., 2016; Tsai & Chen, 2016) e anti-inflamatórios (Junge et al., 2014; Shahid et al., 2016; Wein et al., 2013), embora se estendam aos mecanismos de proteção da pele (Junge et al., 2014) e aos antidiabéticos (Wein et al., 2013).

Porém, o mecanismo anticancerígeno parece estar bem esclarecido, indicando que esta molécula atua essencialmente sobre a apoptose, estimulando os genes e proteínas responsáveis por este processo, a proteína p53 e a caspase-3, e inibindo a expressão do oncogene antiapoptótico Bcl-2 (Shahid et al., 2016; Tsai & Chen, 2016).

Quando analisadas as propriedades dos *withanolidos* e do ácido ascórbico voltamos a verificar a forte incidência sobre as propriedades antioxidantes (Hattiwale et al., 2013; Kour et al., 2009; Moretti et al., 2013), mas também já uma certa direção para o campo neuronal, que no caso dos *withanolidos* incide sobre a memória e a transmissão de informação (Kuboyama et al., 2005) e no caso do ácido ascórbico se estende ao campo da depressão (Rosa et al., 2016).

No que respeita aos ácidos fenólicos as propriedades benéficas são bastante variáveis e destacam-se as propriedades anti-inflamatórias (Pragasam et al., 2013; Zhang et al., 2014) e antidiabéticas (Narasimhan et al., 2013; Yoon et al., 2013).

Dentro das propriedades anti-inflamatórias, os ácidos fenólicos conseguem atingir especificamente o prurido, por inibição de recetores estimulados por péptidos semelhantes à histamina indutores de moléculas pro-inflamatórias (Pradhananga & Shim, 2015).

É de referenciar que estes ácidos possuem ainda propriedades que afetam o sistema nervoso central, contribuindo para o controlo da doença de Alzheimer por inibição da deposição de A β e IL-1 β (Yan et al., 2013) e propriedades que interferem com o metabolismo lipídico por estimulação de enzimas responsáveis pela oxidação de ácidos gordos na mitocôndria e de promotores da transcrição de genes que metabolizam os lípidos reservados nos miócitos (Yoon et al., 2013).

Por último identificaram-se as propriedades de diversos flavonóides, que podem ser divididas em três grandes grupos: benéficas para o sistema nervoso (Kumar et al., 2014; Richetti et al., 2011; Schwingel et al., 2014), anti-inflamatórias e protetoras do sistema cardiovascular (Guo et al., 2015; Kong et al., 2011; Zang et al., 2015; Zhao et al., 2014) e anticancerígenas (Angst et al., 2013; Du et al., 2010; Zang et al., 2014).

Relativamente à sua ação anticancerígena, os flavonoides embora sendo um único grupo químico atuam por meio de diferentes mecanismos. Por exemplo, enquanto a quercitina exerce a sua ação anticancerígena por estimulação de mediadores inflamatórios e de células T do sistema imunitário (Angst et al., 2013; Duo et al., 2010), a miricetina exerce

a mesma ação via apoptose e alteração de proteínas envolvidas no ciclo celular e promotoras da mitose (Zang et al., 2014).

Não devem também ser negligenciadas as propriedades antidiabéticas destes fitoquímicos, cujos mecanismos de ação passam por promover o armazenamento de glucose a nível das células musculares (Alkhalidy et al., 2015) e por favorecer a diminuição dos níveis plasmáticos de glucose por diminuição da resistência periférica à insulina (Zang et al., 2015).

Assim, este capítulo permite-nos supor que embora as propriedades apresentadas por cada constituinte sejam vastas, muitas delas são comuns a diferentes constituintes. Fazendo todos estes fitoquímicos parte da composição da *physalis*, a sinergia entre as suas propriedades poderá evidenciar os benefícios da planta para a saúde.

4. *Propriedades benéficas para a saúde de extratos de physalis*

Tal como sugerido pelos estudos encontrados para os constituintes da *physalis*, a Tabela 3 apresenta uma compilação de estudos em que as propriedades diferem bastante entre si, embora estejam de acordo com o reportado pelos estudos feitos com os constituintes.

Também como aconteceu nos estudos feitos com constituintes da *physalis*, as amostras utilizadas são ratos e linhagens celulares selecionadas.

Tabela 3. Propriedades benéficas para a saúde de extratos da *physalis*

Autores	Extrato	Amostra	Protocolo de estudo		Efeito benéfico para a saúde	Resultados
			Tempo	Quantidade		
Gallagher et al. (2015)	Diclorometano/ metanol	Linhas celulares da cabeça e pescoço e não cancerígenas da mama de rato	21 dias	10mg/kg/dia	Anticancerígeno	Decréscimo na expressão de proteína cinase B (Akt), aumento da clivagem da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) e da proteína de choque térmico 32 (HSP32), resultando na indução da apoptose
Hassan & Ghoneim (2013)	Aquoso	Ratos albinos machos diabéticos	21 dias	1ml de extrato por dia	Antidiabético	Diminuição dos níveis plasmáticos de glucose, TNF- α e IL-6, mas aumento da produção de insulina no pâncreas
Hsu et al. (2012)	-	Células humanas de melanoma maligno (A375 e A2058) e mioblastos de rato H9c2	24h	3 μ g/ml	Anticancerígeno	Inibição do oncogene viral homólogo 1 de sarcoma (BRAF1), sobreexpressão de NOXA nas primeiras 2h e nas horas subsequentes da proteína 4 de Bcl-2 (Bax) e de caspase-3
Kang, Kwon & Choi (2011)	Metanol Água Clorofórmio	Ratos BALB/c	24h	5,10,25,50 e 100 μ l/ml	Anti-inflamatório	Redução da produção de TNF- α , IL-6 e iNOS pela fração de clorofórmio do extrato; inibição da expressão de NF-kB (I κ B α) e do gene transdutor de sinal e ativador da transcrição 1 (STAT1) por meio do sistema lipopolissacarídeo (LPS); ativação da proteína cinase ativada por mitogénio (MAPK)
				60 e 120 μ l/ml		
				5 e 10 μ l/ml		
Moneim et al. (2014)	Metanol	Ratos Wistar	5 dias	20mg/kg/dia	Neuroprotetor	Diminuição dos níveis de peroxidação lipídica, NO e glutatona no cérebro, previamente aumentados pela presença de cádmio
Nogueira et al. (2013)	Etanol	Ratos CBA	0, 24h	1% (v/v)	Antileishmaniose	Ao fim de 48h denotou-se uma diminuição de 91,8% na presença de formas amastigotas, sem indução de toxicidade nos macrófagos; valores de concentração para inibição dos parasitas em 50% inferiores aos de anfotericina B (controlo)
Ooi, Muhammad & Sulaiman (2010)	Clorofórmio	Células do carcinoma do ovário humano Caov-3	24, 48 e 72h	3,125-100 μ l/ml	Anticancerígeno	Aumento da produção de c-myc e p53 na primeira hora e posteriormente de caspase-3; alterações morfológicas demonstrativas de apoptose e autofagia

Autores	Extrato	Amostra	Protocolo de estudo		Efeito benéfico para a saúde	Resultados
			Tempo	Quantidade		
Othman, Nada, Zaki & Moneim (2014)	Metanol	Ratos Wistar	5 dias	200mg/kg	Protetor da toxicidade testicular	Redução dos níveis de MDA, NO; subexpressão de caspase-3 e aumento dos níveis de glutatona; aumento da atividade da SOD, GSH-Px, glutatona redutase e CAT; aumento dos níveis de testosterona
Raju & Mamidala (2015)	Hexano/metanol	Ratos Wistar	14 dias	25 e 50mg/kg	Antidiabético	Redução significativa dos níveis plasmáticos de glucose
Ramadan, Hassan, Elsanhoty & Sitohy (2012)	Aquoso	Ratos albinos (machos)	60 dias	5 e 15%	Hipocolesterolémico e hipoglicémico	Diminuição dos níveis plasmáticos de glucose; decréscimo de 31,6% no colesterol total comparativamente aos valores do grupo de controlo; aumento dos níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) e diminuição dos níveis de lipoproteína de baixa densidade (LDL) em quase 50%; diminuição dos valores previamente elevados pela hipercolesterolemia, de aspartato aminotransferase (AST) e de alanina aminotransferase (ALT), com redução de danos hepáticos e cardíacos
Soares et al. (2006)	DMSO	Esplenócitos com concavalina-A (Con-A) ativada de ratos BALB/c	24, 48 e 72h	2µg/ml	Imunossupressora	Inibição da produção de IL-2 pelos esplenócitos com concavalina-A (Con-A) ativada; inibição da proliferação de linfócitos; aumento da atividade do extrato na presença de um recetor de glucocorticoide (RU486); após 25 dias de transplantação, 50-66% dos animais não apresentava sinais de rejeição.
		Ratos BALB/c após transplantação	30 dias	1mg/rato/dia		
Sutrisna, Indwianastuti & Haryadi (2012)	Etanol	Células de cancro da mama MCF-7	24h	10, 20 e 40µg/ml	Anti-inflamatório e anticancerígeno	Inibição da atividade da COX-2, tendo como consequência a diminuição da proliferação tumoral
				20, 40, 60 e 180µg/ml (efeito citotóxico)		
Taj, Khan, Sultana, Ara & Ehteshamul-Haque (2014)	Etanol Aquoso	Ratos Wistar	6 dias	250mg/kg/dia (aquoso) 500mg/kg/dia (etanólico)	Hepatoprotetor	Diminuição dos níveis de AST, ALT, bilirrubina, creatinina e ureia, cujo aumento foi previamente induzido pela presença de tetracloreto de carbono (CCl ₄)

Autores	Extrato	Amostra	Protocolo de estudo		Efeito benéfico para a saúde	Resultados
			Tempo	Quantidade		
Wu et al. (2004)	Etanol Aquoso	Células de hepatoma Hep G2, Hep 3B Células PLC/PRF/5	48h	10, 30 e 50µg/ml	Anticancerígeno	Inibição da proliferação das células Hep G2 por ambos os extratos por estabilização do ciclo celular na fase S; inexistência de toxicidade sobre os hepatócitos dos ratos BALB/c; indução de apoptose por alterações no metabolismo lipídico e diminuição do potencial de membrana na mitocôndria, tendo como consequência uma diminuição na glutatona e aumento dos radicais livres
			48h	10 e 50µg/ml		
			48h	50µg/ml		
Wu et al. (2009)	Etanol Aquoso Dióxido de carbono supercrítico	Células de carcinoma do pulmão H661	24h	1, 10, 30, 50 e 100µg/ml	Anticancerígeno	Paragem do ciclo celular na fase S por retenção do pico Sub-G1 por ação do extrato de dióxido de carbono supercrítico; inibição da proteína inativadora da apoptose e aumento da expressão de Bax; alteração da expressão caspase-3 e p53; clivagem da PARP
Li et al. (2014)	-	Células HeLa, U251 e HL-60	24h	0-50µM	Anticancerígeno	Elevada atividade citotóxica, sobretudo por ação de <i>withanolidos</i> e fialinas

Tal como esperado, as propriedades apresentadas pelos diversos extratos da *physalis* assemelham-se às referenciadas para os seus constituintes, com especial destaque para as propriedades anticancerígenas (Gallagher et al., 2015; Hsu et al., 2013; Li et al., 2014; Ooi et al., 2010; Sutrisna et al., 2012; Wu et al., 2004; Wu et al., 2009) e antidiabéticas (Hassan & Ghoneim, 2013; Raju & Mamidala, 2015; Ramadan et al., 2012).

No entanto, é de notar também os efeitos anti-inflamatório (Kang et al., 2011; Sutrisna et al., 2012), hepatoprotetor (Taj et al., 2014), imunossupressor (Soares et al., 2006), antiparasitário (Nogueira et al., 2013) e antioxidante/desintoxicante (Moneim et al., 2014; Othman et al., 2014).

No que respeita aos mecanismos anticancerígenos, a *physalis* apresenta uma grande multiplicidade que parece estar dependente do tipo de extrato utilizado. O extrato aquoso e o etanólico parecem incidir mais sobre a inibição do ciclo celular, indução da apoptose por intermédio de genes proapoptóticos e por indução da formação de radicais livres via alteração do potencial de membrana das mitocôndrias, tal como o extrato de dióxido de carbono supercrítico (Wu et al., 2004; Wu et al., 2009).

Já os extratos metanólicos, alguns com frações de clorofórmio exercem a sua atividade predominantemente por via apoptótica, regulando a sobre-expressão das caspases e da proteína p53, bem como do Bcl-2 (Gallagher et al., 2014; Hsu et al., 2014; Ooi et al., 2010).

Por outro lado, verifica-se que independentemente do tipo de extrato, a *physalis* revela elevado efeito protetor nas vias cardiovasculares, por aumento dos níveis plasmáticos de HDL em e diminuição dos níveis de LDL (Ramadan et al., 2012) e indiretamente pela inibição de mediadores inflamatórios, como a COX-2 (Sutrisna et al., 2012), TNF- α , IL-6, iNOS e NF-kB (Kang et al., 2011).

No seguimento da atividade anti-inflamatória, temos as propriedades antioxidantes dos extratos, que resultam na proteção do cérebro por diminuição dos níveis de NO e glutatona (Moneim et al., 2014) e na proteção do fígado e testículos, por aumento da atividade das enzimas antioxidantes como a SOD, CAT e GSH-Px (Othman et al., 2014),

com consequente diminuição dos níveis de transaminases, ureia e creatinina (Taj et al., 2014).

Contudo, a *physalis* desempenha ainda um importante papel no controlo da glucose plasmática (Raju & Mamidala, 2015), não só como consequência da diminuição das moléculas inflamatórias, mas também pela estimulação da secreção de insulina pelas células β pancreáticas (Hassan & Ghoneim, 2013).

Por fim, também de grande importância é a atividade imunossupressora que a *physalis* apresenta perante uma transplantação, uma vez que tem capacidade para inibir pro-inflamatórios como a IL-2 e a Con-A, simultaneamente mostrando afinidade para os recetores de glucocorticoides. Como tal, a *physalis* aparenta ter um mecanismo semelhante ao dos corticoides, o que a propõe como um bom adjuvante nesta terapêutica imunossupressora (Soares et al., 2006).

Em suma, a compilação mostrada neste capítulo revela uma diversidade de propriedades que incitam a que seja testada em ensaios clínicos com o intuito de se comprovarem as suas atividades farmacológicas.

5. *Aplicações empíricas e estudos clínicos das propriedades da physalis*

Embora os ensaios clínicos realizados com formas farmacêuticas produzidas a partir de *physalis* sejam praticamente inexistentes, o uso desta planta como mediador terapêutico e atenuador de sintomas já é conhecido empiricamente.

Na medicina Unani, um tipo de medicina indiana, já são várias as formulações que utilizam diferentes espécies de *physalis* associadas a outras plantas, sob a forma de decocção, pasta ou comprimido, com o intuito de aliviar os sintomas causados pela gota (Akram, Usmanghani, Ahmed, Azhar & Hamid, 2014).

Do mesmo modo, os estudos etnofarmacológicos de Bourdy et al. (2000), realizados na Bolívia e abordando os usos de várias plantas por uma comunidade local, demonstram

que a decocção das raízes de diferentes espécies de *physalis* parecem ser eficazes contra gripes, febre e dores reumáticas.

As utilizações da *physalis* estendem-se ao cancro, asma, hepatite e problemas dermatológicos, em diversas populações indígenas, sendo o seu consumo feito sob a forma de sumo ou compota (Zavala et al., 2006).

Embora não existam ensaios clínicos que comprovem as propriedades benéficas da *physalis* para os humanos, o estudo de Romero-Cerecero, Reyes-Morales, Aguilar-Santamaría, Huerta-Reyes & Tortoriello-Garcia (2009) demonstra que várias plantas, incluindo a *physalis*, são utilizadas por doentes diabéticos tipo 2. Estes doentes, seguidos em hospitais públicos no México, fazem uso destas plantas que ajudam a baixar os seus níveis de glucose, concomitantemente com a terapêutica oral.

A favor desta evidência, o estudo de Ankrah et al. (2003) demonstra o potencial de uma decocção preparada com *Jatropha curcas*, *Gossypium hirsutum*, *Physalis angulata* e *Delonix regia*, sobre 5 doentes suspeitos de infeção por malária. Os resultados demonstram a erradicação dos parasitas presentes nas células sanguíneas dos doentes, bem como de ratos Sprague-Dawley, sem que se tenha identificado qualquer efeito tóxico para os indivíduos.

Contudo, será necessário que se criem novas formulações e se invista em formas farmacêuticas mais controladas para que seja possível a realização de ensaios clínicos que atestem as propriedades farmacológicas da *physalis*, bem como os possíveis riscos da sua toxicidade para definir a dose adequada de consumo.

Dada a grande dispersão de informação no que respeita à constituição e actividade antioxidante desta planta e o facto de a ingestão deste alimento ter vindo a aumentar em Portugal, este trabalho pretende contribuir para a caracterização da *physalis* comercializada em Portugal.

Materiais, reagentes e métodos

1. Pesquisa bibliográfica

A metodologia utilizada para contruir a monografia deste trabalho começou por fazer uma pesquisa mais abrangente na b-on e no PubMed. Nestas duas bases de dados foram inseridas as seguintes palavras-chave, sem qualquer critério de inclusão ou exclusão: “*Physalis peruviana*” (68 artigos); “*Physalis* constituents” (1153 artigos); “*Physalis* antioxidant capacity” (520 artigos) e “*Physalis* health benefits” (92 artigos).

A partir deste grupo de palavras-chave surgiram vários artigos, referenciando diferentes métodos para identificação dos constituintes da *physalis*, tendo depois restringido a pesquisa a “*Physalis* HPLC” (23 artigos). Do mesmo modo, surgiram artigos referenciando os constituintes de várias partes da planta e as respetivas propriedades.

Após a seleção dos constituintes mais mencionados nos estudos anteriores, foi feita nova pesquisa com o intuito de obter estudos referentes às propriedades benéficas de cada constituinte. As palavras-chave utilizadas foram: “ β -carotene health properties” (179 artigos), “Ascorbic acid health properties” (403 artigos), “Physalins health properties” (110 artigos), “*physalis* flavonoids health properties” (1037 artigos), “catechin health properties” (253 artigos) e “fenolic acids health properties” (190 artigos). Dentro do grupo dos flavonoides especificou-se ainda mais a pesquisa direcionando-a para os mais abundantes na *physalis*.

Relativamente aos benefícios a nível da saúde, foi feita uma pesquisa mais direcionada, utilizando como critério de inclusão o ano de publicação, o tipo de estudo (com animais ou células *in vitro*) e posteriormente procurou-se ensaios clínicos.

Quanto à parte experimental, a pesquisa afunilou-se no que respeita à parte da atividade antioxidante e utilizando as mesmas bases de dados registaram-se as seguintes palavras-chave: “*physalis* free radical scavenging”, “*physalis* ABTS”, “*physalis* FRAP”, “*physalis* NO and O₂” e “*physalis* total phenolic content”.

2. Reagentes e soluções

A quercitina ($\geq 99\%$), miricetina ($\geq 99\%$) e kaempferol ($\geq 99\%$) foram adquiridos na Extrasynthese, enquanto a rutina ($\geq 97\%$) e o ácido gálico foram adquiridos na Acro Organics. Na Sigma-Aldricha adquiriram-se os reagentes catequina ($\geq 99\%$), cloreto de nitrotetrazolium azul (NBT) 98%, metassulfato de fenazina (PMS) ($\geq 90\%$), beta-nicotinamida adenina dinucleótido (NADH) ($\geq 97\%$), 2,4,6-tri(2-piridil)-s-triazina 10mM (TPTZ) ($\geq 97\%$), 2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) ($\geq 98\%$), 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico (Trolox) (97%) e tampão fosfato salino. Da Merck adquiriram-se o ácido sulfanílico (99%) e o N-(1-naftil) etilenodiamina dicloridrato (NED). Foram ainda adquiridos o Folin-Ciocalteu da Panreac, o β -caroteno ($\geq 97\%$) da Fluka e o nitroprussiato de sódio (99%) da Riedel-de Haen.

3. Aparelhagem

3.1.1. Balanças

As pesagens dos reagentes foram efetuadas nas balanças analíticas Sartorius CPA 225D, ($\pm 0,01\text{mg}$) e Sartorius ($\pm 0,1\text{mg}$).

3.1.2. Espectrofotómetro

A leitura de absorvâncias de todos os testes realizados neste trabalho experimental foram obtidas no espectrofotómetro UV-visível Perkin-Elmer 25.

3.1.3. Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC)

O aparelho é da autoria da Merck-Hitachi e consiste numa Intelligent Pump L-6200A da Merck-Hitachi com uma válvula de injeção Rheodyne 7125 de 20 μL de capacidade. A deteção da absorvância normalizada de cada composto é feita através de um detetor com vetor de díodos "DAD" Diode Array UV-visível L-4500 da Merck-Hitachi. A interface de ligação ao computador é uma D-7000 Merck-Hitachi.

A introdução da amostra no injetor fez-se com uma seringa Hamilton de 100 μL .

3.1.4. Água ultrapura

A água ultrapura foi obtida pelo aparelho de purificação de água com resistividade 18,2 Ω ohm, Sinergy UV Ultrapure (Type I) Water.

4. *Extração de carotenoides*

A preparação da *physalis* para extração de carotenoides foi realizada segundo o método de Briones-Labarca et al. (2013) com algumas modificações. O fruto foi lavado e conservado à temperatura de -20°C até à sua utilização.

Pesou-se 10g de fruto, esmagou-se e extraiu-se com hexano:acetona:etanol (50:25:25 v/v/v), sob agitação. Após extração no solvente, o extrato foi submetido a filtração com vácuo até perda total da cor do resíduo e adicionou-se 100ml de água destilada para lavagem do extrato, descartando-se a fase aquosa e fazendo-se a secagem com 4g de sulfato de sódio.

O extrato foi levado ao rotavapor a 50°C e perpez-se o volume final com 100ml de hexano, armazenando-se em alíquotas a -70°C.

5. *Extração de fenóis e outros fitoquímicos*

A extração de fenóis e outros fitoquímicos com afinidade para a água foi realizada de acordo com o método de Vasco, Ruales & Kamal-Eldin (2008), mediante ligeiras alterações.

Após descongelação da *physalis*, pesou-se 1g de fruto e submeteu-se a uma extração dupla sob agitação contínua e à temperatura ambiente. Primeiramente a extração foi feita com 40ml de metanol:água (50:50 v/v) e posteriormente com 40ml de acetona:água (50:50 v/v). Após esta última extração, o extrato submetido a uma centrifugação de 4000 rpm durante 15 minutos.

Os sobrenadantes foram recolhidos, foi retirada a parte da acetona e certificou-se que o extrato obtido ficou em metanol:água (50:50 v/v). Por fim, armazenou-se o extrato em alíquotas a -70°C.

6. *Extração de flavonoides*

A extração de flavonoides a partir do fruto de *physalis* foi efetuada segundo o método de Sathyadevi & Subramanian (2015) modificado.

Esmagou-se 100g de frutos de *physalis* e colocou-se em estufa de ar quente, a 50°C, durante 24 horas.

Após secagem reduziu-se o fruto a pó e procedeu-se à deslipidação em éter de petróleo, à temperatura de 80°C durante 10 horas. O extrato resultante foi filtrado e submetido a uma extração com 95% de etanol, que depois se evaporou no rotavapor à temperatura de 45°C. O balão foi conservado à temperatura de -20°C até utilização e imediatamente reconstituído em 440ml de metanol aquando da sua utilização.

7. *Extração com hidrólise ácida*

Esta extração foi realizada de acordo com o método de Licodiedoff et al. (2013).

Pesou-se 30g de *physalis* fruto e triturou-se com 0,02g de ácido ascórbico, adicionando-se posteriormente 10 ml de ácido clorídrico (HCl) 4M.

Para uma outra extração repetiu-se o procedimento, mas no fim adicionou-se 10 ml de HCl 8M.

Ambos os extratos foram submetidos a refluxo à temperatura de 74°C durante uma hora e trinta minutos, seguindo-se a sua filtração sob vácuo.

Após filtração o solvente foi evaporado até à secura, de modo a remover parte do ácido, reconstituindo com 25 ml de metanol e guardado à temperatura de -20°C.

Antes da injeção em cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) os extratos foram filtrados com filtros Millipore de poro 0,45 µm.

8. Determinação de fenóis totais

A determinação de fenóis totais foi feita com base no método de Prabha & Vasantha (2011), utilizando o extrato metanol:água e o extrato de metanol de *physalis*.

A reta de calibração foi contruída com as seguintes concentrações de ácido gálico padrão, em metanol:água (50:50, v/v): 50, 100, 150, 200 e 250 mg/L.

A 500 µl de amostra adicionou-se 5 ml de uma solução aquosa de Folin-Ciocalteu (1:10 em água destilada) e 4 ml de carbonato de cálcio (Na₂CO₃) 1M. Este procedimento foi repetido para os padrões e o branco metanol:água.

Colocou-se os tubos em repouso durante 15 minutos, à temperatura ambiente e procedeu-se à leitura das absorvâncias, em espectrofotômetro UV-visível a 765nm.

O ensaio foi realizado em triplicado e os resultados expressos em mg equivalentes de ácido gálico/g de *physalis*.

9. Determinação de flavonoides totais

A quantificação de flavonoides totais realizou-se segundo o método descrito por Praba & Vasantha (2011).

Utilizou-se 1,5 ml de extrato metanólico nas diluições de 1:5 e 1:10, respetivamente, às quais se adicionou 75µl de cloreto de alumínio anidro 10%, 75µl de acetato de potássio 1M e 2,1ml de água destilada e deixou-se repousar 30 minutos, após os quais se procedeu à leitura das absorvâncias a 415 nm..

Dado que a amostra era corada, foi necessário fazer brancos em que o cloreto de alumínio foi substituído por água destilada, evitando a formação do complexo.

Foi traçada uma reta de calibração com quercitina em metanol, nas seguintes concentrações: 10, 30, 50 e 70mg/L.

O ensaio foi realizado em triplicado e os resultados expressos em mg de equivalentes de quercitina/g de *physalis*.

10. Quantificação de β -caroteno

A quantificação de β -caroteno em extrato de hexano de *physalis* fez-se segundo o método de Briones-Labarca et al. (2013), ao comprimento de onda 450 nm.

Construiu-se uma curva de calibração com padrão de β -caroteno em hexano, cujo valor das concentrações foi de 0,0175; 0,035; 0,051; 0,068 e 0,085 g/L.

Os resultados são apresentados em mg equivalentes de β -caroteno/g de *physalis*.

11. Condições cromatográficas para identificação de ácidos fenólicos e catequina

Para se proceder à identificação de ácidos fenólicos, a separação dos constituintes foi realizada em uma coluna de fase reversa Merck Licrospher® 100 250RP-C18 (250mm x 4mm, 5 μ m), com um volume de injeção de 10 μ l e um fluxo de 0,6 ml/min, à temperatura de 40°C.

Este método é uma adaptação do método descrito por Nogata, Ohta, Yoza, Berhow e Hasegawa (1994), pelo que se utilizou como fase móvel ácido trifluoroacético (300 μ l/L):metanol e cujo gradiente utilizado para separação dos vários constituintes se encontra descrito na tabela 4.

Com este método foram injetadas as duas amostras sujeitas a hidrólise ácida (4M e 8M) e um padrão de catequina $9,26 \times 10^{-4}$ M.

Tabela 4. Gradiente de separação dos compostos em HPLC

Tempo (min)	Ácido trifluoroacético (300µl/L) (%)	Metanol (%)	Fluxo (ml/min)
0	95	5	0.6
5	95	5	0.6
10	70	30	0.6
25	64	36	0.6

12. Condições cromatográficas para identificação de flavonoides

O equipamento utilizado para proceder à identificação dos flavonoides presentes na *physalis* foi o mesmo que para a identificação dos ácidos fenólicos e catequina, mantendo-se também o fluxo e o volume de injeção.

No entanto, o método utilizado resultou de alterações feitas ao método de Nuutila, Kammiovirta & Oksman-Caldentey (2002), à temperatura de 38°C, e o gradiente encontra-se descrito na tabela 5.

Também neste método se injetaram as duas amostras sujeitas a hidrólise ácida (4M e 8M) e padrões de rutina, miricetina, quercitina e *kaempferol*, cujas concentrações são respetivamente $3,37 \times 10^{-4}$ M, $5,38 \times 10^{-4}$ M, $7,51 \times 10^{-4}$ M e $6,49 \times 10^{-4}$ M.

Tabela 5. Gradiente de separação dos flavonoides em HPLC

Tempo (min)	Ácido trifluoroacético (300µl/L) (%)	Metanol (%)	Fluxo (ml/min)
0	80	20	0.6
40	40	60	0.6
45	0	100	0.6
50	0	100	0.6

13. Poder antioxidante redutor do ferro (FRAP)

O teste da capacidade redutora do extrato metanol:água e do extrato em hexano de *physalis* foi realizado segundo o método de Thaipong, Cisneros-Zevallos, Boonprakob, Crosby & Byrne (2006).

Procedeu-se à preparação da solução stock, constituída por 100ml de tampão acetato 300mM, a pH 3,6, com 10ml de TPTZ 10mM em HCl 40mM e 10ml de cloreto de ferro hexa-hidratado 20mM ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), mantida a 37°C até à altura da sua utilização.

A curva de calibração foi construída com as seguintes concentrações de trolox em água: 20, 50, 200, 400, 600 e 800µM.

Juntou-se 2850µl da solução stock a 150µl de cada extrato e procedeu-se da mesma forma com os padrões e os respetivos brancos: um branco metanol:água (50/50, v/v) e um branco hexano. Por fim, deixou-se repousar no escuro, durante 30 minutos e procedeu-se à leitura das absorvâncias no comprimento de onda de 593 nm.

O ensaio foi realizado em triplicado e os resultados expressos em µmoles de trolox/g de *physalis*.

14. ABTS

A realização do teste de captação do radical ABTS seguiu o método de Zulueta, Esteve & Frígola (2009) ajustado.

Primeiramente preparou-se a solução mãe adicionando 10ml de ABTS 7mM a 176µl de persulfato de potássio 140mM, cujo tempo de incubação foi de 12 horas, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz.

Após o tempo de incubação, diluiu-se a solução em etanol até atingir uma absorvância de 0,7 a 734 nm.

Adicionou-se 2850 µl desta solução a 150 µl de amostra de extrato metanol:água e de extrato em hexano, nas diluições 1:1,5; 1:2 e 1:3. Procedeu-se de igual modo para os brancos etanol:água (50/50, v/v) e hexano e para os padrões.

A curva de calibração foi construída com padrões de trolox com concentrações de 20, 50, 200, 400, 600 e 800 µM.

Por fim efetuou-se a leitura em espectrofotómetro de UV-visível a 734 nm. O ensaio foi realizado em triplicado, os resultados estão expressos em µmoles de trolox/g de *physalis* e a percentagem de inibição do radical é dada pela equação 1:

$$\%I = \frac{A_{branco} - A_{amostra}}{A_{branco}} \times 100$$

15. Teste do radical óxido nítrico (NO[•])

Este teste foi aplicado com base no método descrito por Nikkhah, Khayami & Heidari (2008).

Colocou-se 2ml de nitroprussiato de sódio 10mM, juntamente com 0,5ml de PBS e 0,5ml de amostra. Foram feitas três diluições, quer do extrato metanol:água, quer do extrato de hexano. Essas diluições foram respetivamente 1:1,5; 1:2 e 1:3.

De seguida, colocaram-se os tubos a incubar durante 150 minutos, à temperatura de 25°C. Após o período de incubação, transferiu-se 0,5ml da solução para novos tubos e adicionou-se 1 ml de ácido sulfanílico (0,33% em ácido acético glacial 20%), deixando os tubos novamente em repouso, durante 5 minutos, à temperatura ambiente.

Por último adicionou-se 1 ml de NED 0,1% (m/v) e incubou-se novamente a 25°C por 30 minutos.

Aquando do fim da incubação, seguiu-se a leitura em espectrofotómetro UV-visível do cromóforo rosa formado, a 540 nm. Procedeu-se da mesma forma para realização de brancos ou controlos etanol:água (50/50, v/v) e hexano.

O ensaio foi realizado em triplicado e a percentagem de inibição do radical óxido nítrico determinou-se utilizando a equação 1.

16. Teste do radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$)

O teste de inibição do radical $O_2^{\cdot-}$ foi realizado segundo o método de Yu et al. (2009). Para realização do teste de inibição do radical superóxido colocou-se 0,5ml de amostra num tubo de vidro, ao qual se adicionou 2 ml da solução NADH $189\mu\text{M}$ e NBT $120\mu\text{M}$ em tris-HCl (40mM , pH 8). Para iniciar a reação adicionou-se 0,5ml de PMS $60\mu\text{M}$.

As amostras utilizadas foram o extrato metanol:água de *physalis* e o extrato de hexano, ambos nas diluições de 1:1,5; 1:2 e 1:3. O mesmo procedimento foi utilizado para os dois brancos ou controlos: de etanol:água (50:50, v/v) e hexano.

Após um período de incubação de 5 minutos à temperatura ambiente seguiu-se a leitura das respetivas absorvâncias em espectrofotómetro de UV-visível a 560 nm. O ensaio foi realizado em triplicado e a percentagem de inibição do radical superóxido determinou-se utilizando a equação 1.

Resultados e Discussão

A realização de diferentes extrações a partir do fruto de *physalis* permitiu quantificar diferentes grupos de fitoquímicos, que se encontram descritos na Tabela 6, com os respectivos valores de concentração.

Tabela 6. Resumo da quantificação de diferentes fitoquímicos (mg/g) em extratos de *physalis*

Teste	Concentração no extrato (mg/g de <i>physalis</i>)		
	Metanol:água	Metanol	Hexano
Determinação de fenóis totais	0,56	0,36	-
Determinação de flavonoides totais	-	0,32	-
Quantificação de β -caroteno	-	-	0,4

1. Quantificação de fenóis totais

A leitura das absorvâncias dos tubos que continham o padrão de ácido gálico permitiu a construção de uma reta de calibração, com as absorvâncias em função das respectivas concentrações (Figura 1).

Através da aplicação da regressão linear ao gráfico traçado com essas mesmas concentrações e absorvâncias, obteve-se a equação $y = 0,0056x + 0,0187$ e um $R^2 = 0,9985$.

Aquando da substituição da absorvância da amostra de extrato metanol:água de *physalis* na equação da reta, o valor de concentração de fenóis na amostra foi de 10,11mg/L, o que equivale a 0,56 mg de equivalentes de ácido gálico/g de *physalis* (SEM \pm 0,06). Já no extracto metanólico os resultados para o mesmo teste são de 0,36mg de equivalentes de ácido gálico/g de *physalis* (SEM \pm 0,003) (Tabela 6).

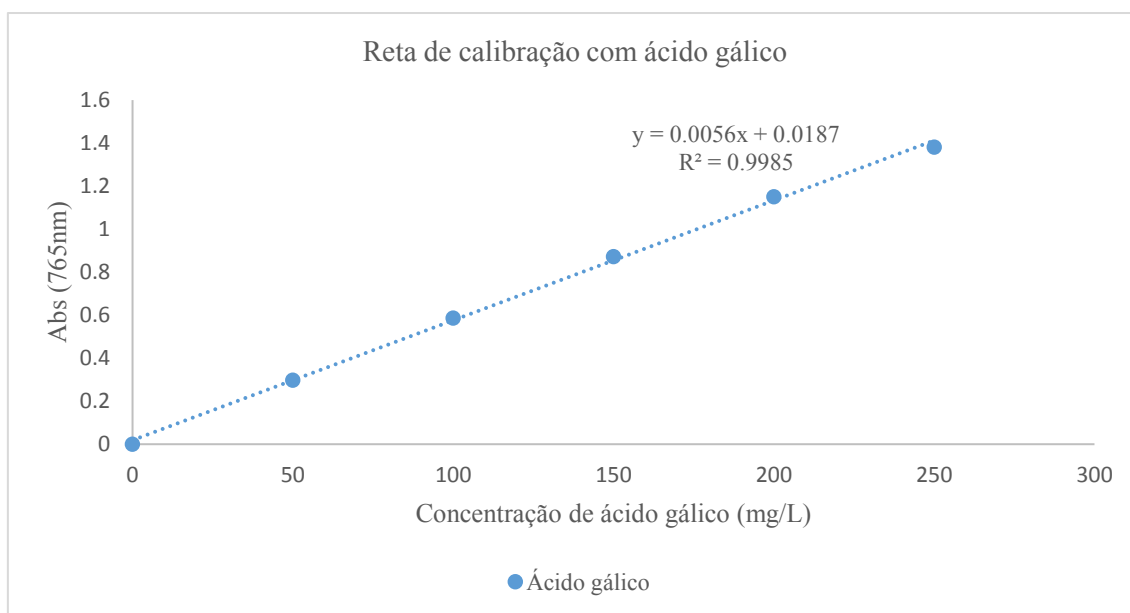


Figura 1. Reta de calibração de ácido gálico para determinação da concentração de fenóis presentes no extrato metanol:água e metanólico de *physalis*

Estes resultados estão de acordo com Vasco et al (2008), cujo modo de extração corresponde ao do extrato metanol:água utilizado neste trabalho experimental e que obteve um valor de 0,87mg de equivalentes de ácido gálico/g de *physalis*. O mesmo acontece com o estudo de Silva et al. (2016), cujo valor de fenóis na *Physalis peruviana* foi de 0,93mg de equivalentes de ácido gálico/g de *physalis*, embora outras espécies de *physalis* apresentassem valores mais baixos.

Contudo, este valor de fenóis é bastante inferior ao valor encontrado no estudo Namiesnik et al. (2014), que encontrou uma concentração de 6,24mg de equivalentes de ácido gálico/g de *physalis* em extrato metanólico. Os mesmos autores relacionam esta quantidade de fenóis com o poder antioxidante determinado no seu extrato metanólico.

Os resultados destes investigadores vieram confirmar o trabalho de Rop et al. (2012), que determinou uma concentração 8,24mg de equivalentes de ácido gálico/g de *physalis*, também em extrato metanólico.

Estudos ainda mais recentes, realizados em extratos etanólicos do fruto de *physalis* indicam que é possível obter concentrações de fenóis de 166,25 mg/g (Zawawy, 2015) ou de 76.84 mg/g de massa seca de fenóis, que é justificável pelo fato da concentração de fenóis no fruto estar dependente da fase de maturação. Esta concentração é inferior nas

fases iniciais de maturação e aumenta exponencialmente, até estabilizar, nas últimas fases (Sthayadevi & Subramanian, 2015), o que indica que a baixa concentração de fenóis pode ser explicada pelo facto da *physalis* utilizada no presente estudo se encontrar numa fase de maturação precoce.

Nestas fases prematuras, a baixa concentração deve-se à menor aderência dos fenóis às células da parede celular, que desempenham a dupla função de agentes protetores contra os patogénios e de fortificação da parede celular (Sthayadevi & Subramanian, 2015). Como consequência da dependência da fase de maturação, a *Physalis peruviana* apresenta uma concentração mais baixa de fenóis do que muitas outras plantas, conhecidas pela sua capacidade antioxidante (Bravo, Alzate e Osorio, in press).

No entanto, não deve ser negligenciado o solvente extrator, tal como verifica o estudo de Ramadan, El-Ghorab & Ghanem (2016), em que a variação de fenóis do extrato de hexano para o extrato etanólico foi de 30 para 89,9 mg/ml.

Estas mesmas variações também podem ser explicadas pela diferença de altitude entre os locais da colheita, como demonstra o estudo de Medina-Medrano et al. (2015), cuja concentração de fenóis totais da *Physalis solanaceae* apresenta uma variação de 46,29 mg/g para 53,14 mg/g, devido à diferença de local de colheita.

Concomitantemente com o local de colheita, a parte da planta de onde se obtém o extrato tem também influência, uma vez que já se verificou que tanto o fruto como o cálice são os locais de maior acumulação de fenóis, sendo a acumulação mais proeminente neste último (Medina-Medrano et al., 2015). Desta forma, seria pertinente que a extração efetuada no presente estudo tivesse incluído o cálice de *physalis*, tendo em vista o aumento da concentração de fenóis no extrato.

Por outro lado, a temperatura é um fator crucial para a preservação dos fenóis, cuja concentração diminui com o aumento de temperatura. Para esta temperatura ocorre um aumento da concentração, que sugere a interconversão dos vários compostos fenólicos em outros mais resistentes, impedindo assim que se perca a sua estrutura (López et al., 2013).

Concordantemente, as experiências de Susanti e os seus colaboradores (2015) evidenciam que a concentração de fenóis passa de 80,62 para 113,18 mg de ácido gálico/g de extrato, há medida que se aumenta a temperatura de extração numa extração supercrítica, para um mesmo valor de pressão. As temperaturas elevadas favorecem a extração dos fenóis, pois reduzem a sua afinidade com a água e promovem a sua ligação aos solventes orgânicos. Nesta perspetiva, as temperaturas a que o extrato foi submetido deveriam suficientemente altas, juntamente com uma pressão controlada, de modo a obter uma extração mais eficiente.

Estes resultados refletem assim, que a concentração de fenóis encontrada mostra-se dependente de vários fatores, tais como o solvente de extração, embora deva salientar-se a fase de maturação do fruto e o tipo de extração utilizado como fatores principais.

2. Quantificação de flavonoides totais

A quantificação de flavonoides foi obtida à custa da reta de calibração com quercitina, cuja equação é $y = 0,0197x - 0,0067$ e cujo R^2 é de 0,9996 (Figura 2).

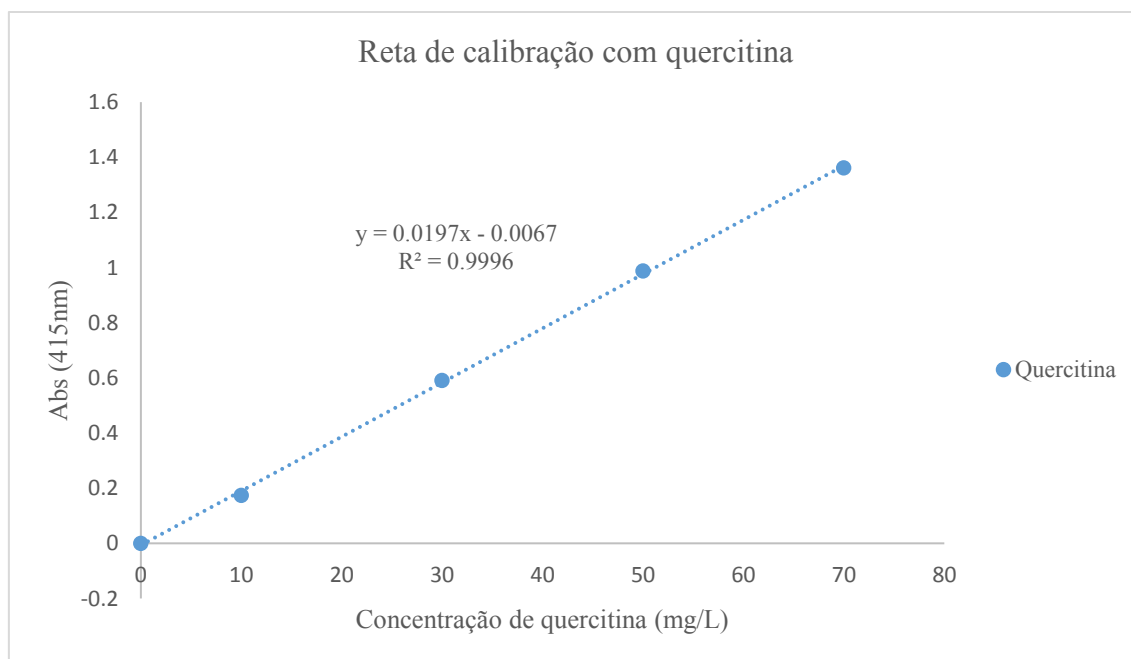


Figura 2. Reta de calibração de quercitina para determinação da concentração de flavonoides presentes no extrato metanólico de *physalis*

A partir da substituição das absorvâncias obtidas para as amostras na respetiva reta obteve-se um valor de concentração de flavonoides de 0,32mg equivalentes de

quercitina/g de *physalis* (SEM \pm 0,003) (Tabela 6), o que representa mais de metade dos fenóis encontrados no extrato metanol:água.

Esta representatividade dos flavonoides poderá indicar que estas moléculas são maioritariamente responsáveis pelo poder antioxidante apresentado pelos fenóis existentes na *physalis* (Rop et al., 2012).

De um modo geral, verificou-se que os flavonoides representam cerca de 16,91% dos fenóis do fruto de *physalis* e 30,43% dos fenóis do cálice, sendo que esta variação não depende apenas da parte da planta, mas também da espécie testada (Medina-Medrano et al., 2015).

Em termos de valor de concentração de flavonoides encontrado, este é similar ao que outros investigadores têm identificado, variando entre 0,29 e 0,45 mg de equivalentes de quercitina/g de *physalis* em extrato metanólico (Namiesnik et al., 2014) e atingindo um valor de 0,64 mg de equivalentes de quercitina/g de *physalis* em extrato etanólico (Zawawy, 2015).

Tal como esperado, a concentração está dependente do solvente extrator, pelo que se verifica que a utilização de acetona no processo de extração poderá ter interferido com o valor encontrado, uma vez que o metanol apresenta maior capacidade de extração de flavonoides abundantes na *physalis* quando sozinho (Licodiedoff et al., 2013).

Porém, é de referir que a quantidade de flavonoides determinada no extrato metanólico do fruto de *physalis* é inferior ao encontrado para outros frutos considerados como potentes antioxidantes, tais como as amoras e os mirtilos (Namiesnik et al., 2014).

No entanto, a extração poderá ser rentabilizada até atingir 0,99 mg de equivalentes de quercitina/g de *physalis* consoante a temperatura aplicada durante a extração, tal como acontece com todos os fenóis. Ao submeter o extrato a temperaturas superiores a 50°C poderá estar em risco a integridade dos flavonoides (López et al., 2013).

Do mesmo modo como acontece com os fenóis, esta concentração poderá ainda ser superior quando se analisam extratos liofilizados, cujos valores atingem 241 mg de

equivalentes de quercitina/g de massa seca de *physalis* (Sathyadevi & Subramanian, 2015), ou quando a extração é feita com dióxido de carbono supercrítico (Hassanien, 2011).

3. Quantificação de β -caroteno

Após a leitura das absorvâncias a 450 nm, obteve-se a seguinte equação da reta, em função das várias concentrações de β -caroteno utilizadas: $y = 18,528x - 0,0089$, e um R^2 de 0,9998 (Figura 3).

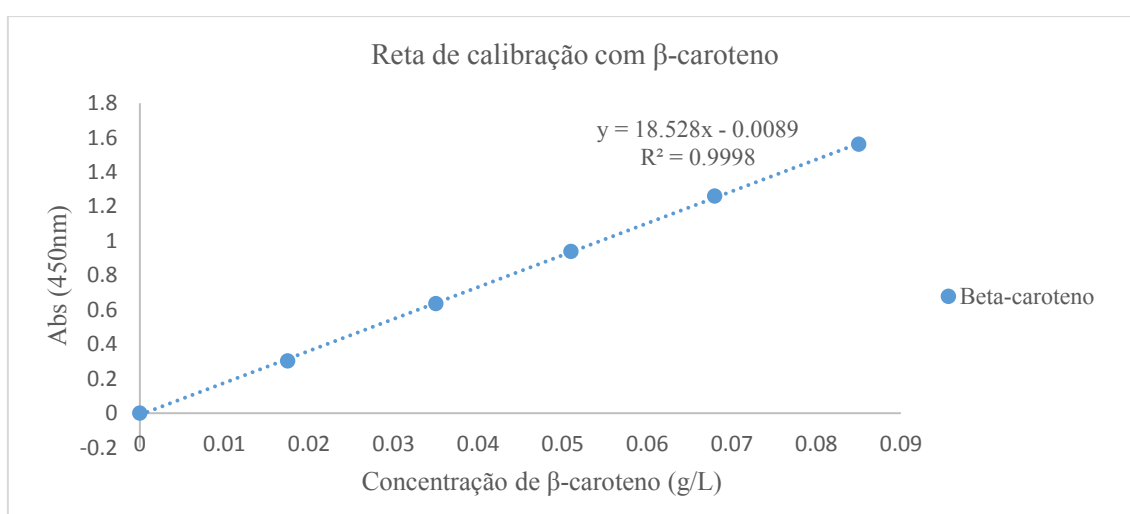


Figura 3. Retra de calibração de β -caroteno para determinação da concentração de carotenoides presentes no extrato de hexano de *physalis*

Utilizando a equação da reta já referida, determinou-se que a concentração de carotenoides presentes no extrato de hexano da *physalis* é de 0.4 mg/g de *physalis* (Tabela 6).

Estes resultados são inferiores ao que tem sido apresentado por outros estudos, como o de Briones-Labarca et al. (2013), cuja concentração de β -caroteno determinada foi de 10,75 mg/g de *physalis* em extrato de hexano. Concordantemente com os resultados destes autores, López et al. (2013) determinaram uma concentração semelhante, de 7,22mg/g de *physalis* num extrato de hexano/acetona/etanol (50:25:25, v/v/v).

Contudo, os mesmos autores apontam uma possibilidade para a baixa concentração de β -caroteno encontrada na presente investigação, mostrando que o aumento de temperatura é responsável pela degradação de pigmentos, como o β -caroteno, e por outras reações não-enzimáticas, tendo como consequência o escurecimento do extrato (López et al., 2013).

Não obstante, esta decomposição do pigmento é mais evidente a 50°C (López et al., 2013), temperatura à qual foi submetida o extrato de hexano utilizado nesta investigação. No entanto, foi já demonstrado, por HPLC-DAD-MS, que o β -caroteno é o carotenoide mais abundante na *physalis* e, conseqüentemente representa 76.8% da capacidade antioxidante deste fruto (Hassanien, 2011).

Estes dados são também suportados pelo estudo de Briones-Labarca et al. (2013), que apresenta a contribuição do β -caroteno em associação com a do ácido ascórbico, como sendo a principal fonte da atividade antioxidante da *physalis*.

4. Identificação de constituintes da *physalis* por HPLC-DAD

De modo a perceber que constituintes poderiam estar presentes no extrato metanólico de *physalis*, procedeu-se à injeção do extrato metanólico, rico em flavonoides. No entanto, como não foram obtidos picos a 365 nm, comprimento de onda correspondente o máximo de absorção de alguns dos flavonoides, verificou-se uma desconcordância com o resultado do teste de flavonoides totais.

No entanto, após pesquisa sobre identificação de flavonoides em HPLC conclui-se que devido a alterações de temperatura os flavonoides podem sofrer polimerização, pelo que dessa forma deixam de ser detetados no seu comprimento de onda (Licodiedoffet al., 2013). Por este motivo procedeu-se à hidrólise ácida com HCl 4M e 8M para testar esta hipótese, verificando-se a existência ou não da presença de picos.

Primeiramente suspeitou-se da presença de catequina, aplicando o método de Nogata et al. (1994), uma vez que o tempo de retenção do pico na amostra sujeita a hidrólise ácida

4M, cujo valor foi de 18,17 minutos (Figura 4B), coincide com o do padrão puro, que corresponde a 18,12 minutos.

Para confirmar estes resultados, procedeu-se à recolha dos respetivos espetros, em cujo máximo de absorção do padrão de catequina foi de 284,32 nm (Anexo 1) e o do pico correspondente na amostra tem o seu máximo a 287,99 nm (Anexo 2), pelo que a sua grande semelhança identifica a catequina no extrato de metanol hidrolisado.

Para além da identificação de catequina utilizou-se a altura dos picos cromatográficos e a sua relação com a concentração em catequina padrão para estimar a possível concentração de catequina na *physalis*, como mostra a Tabela 7.

Tabela 7. Relação entre as alturas dos picos cromatográficos e a concentração de catequina no padrão e na amostra sujeita a hidrólise ácida 4M

	Altura (AU)	Concentração
Catequina padrão	0,18	$9,26 \times 10^{-4}$ M
Pico correspondente ao tempo de retenção da catequina (3 ^o) na amostra 4M (18,17min)	0,11	$5,66 \times 10^{-4}$ M (0,27 mg/g de <i>physalis</i>)

A quantificação de catequina por grama de *physalis* sugere, quando comparada com a quantificação de flavonoides totais, que este composto representa quase a totalidade de flavonoides existentes na *physalis*. Como descrito por Kumar & Pandey (2013), a catequina é um flavon-3-ol, subgrupo de flavonoides que é caracterizado pelas posições em que se encontram os seus grupos hidroxilo.

No entanto, estes estudos são ainda preliminares, pelo que é necessário construir uma curva de calibração com catequina padrão, de modo a fazer uma determinação mais precisa da concentração deste composto na *physalis*.

Relativamente aos picos 1 e 3 no cromatograma A, estes correspondem a ácidos fenólicos desconhecidos, uma vez que se procedeu à sua comparação com espetros de ácidos fenólicos obtidos por Kowalski & Wolski (2003) (Anexo 3). Os espetros usados para

comparação com os espectros dos picos 1 (Anexo 4) e 3 (Anexo 5) foram os de ácido cafeico, ácido cumárico e ácido ferrúlico.

Embora não se tenha verificado uma coincidência nos máximos obtidos, existe uma proximidade entre eles e o perfil do espectro é bastante semelhante, demonstrando a presença de ácidos fenólicos, mesmo não sendo possível atribuir-lhes a respetiva denominação.

Quando comparada a amostra com hidrólise ácida a 8M com 4M verificou-se um aumento da área do pico 1 do cromatograma A para o cromatograma B (1') e que os tempos de retenção não são coincidentes (Figura 4). Estes resultados indicam que o composto não é o mesmo para a hidrólise ácida 4M e 8M, pelo que o pico 3 no cromatograma A ou 4' no cromatograma B poderá ter dado origem a diferentes ácidos fenólicos mediante o tipo de hidrólise.

Por outro lado, uma hidrólise excessivamente ácida poderá não ser a mais adequada para os ácidos fenólicos, pois poderá ocorrer alguma degradação dependendo da planta em si e do tipo de molécula (Nuutila, Kammiovirta e Oksman-Kaldentey, 2002).

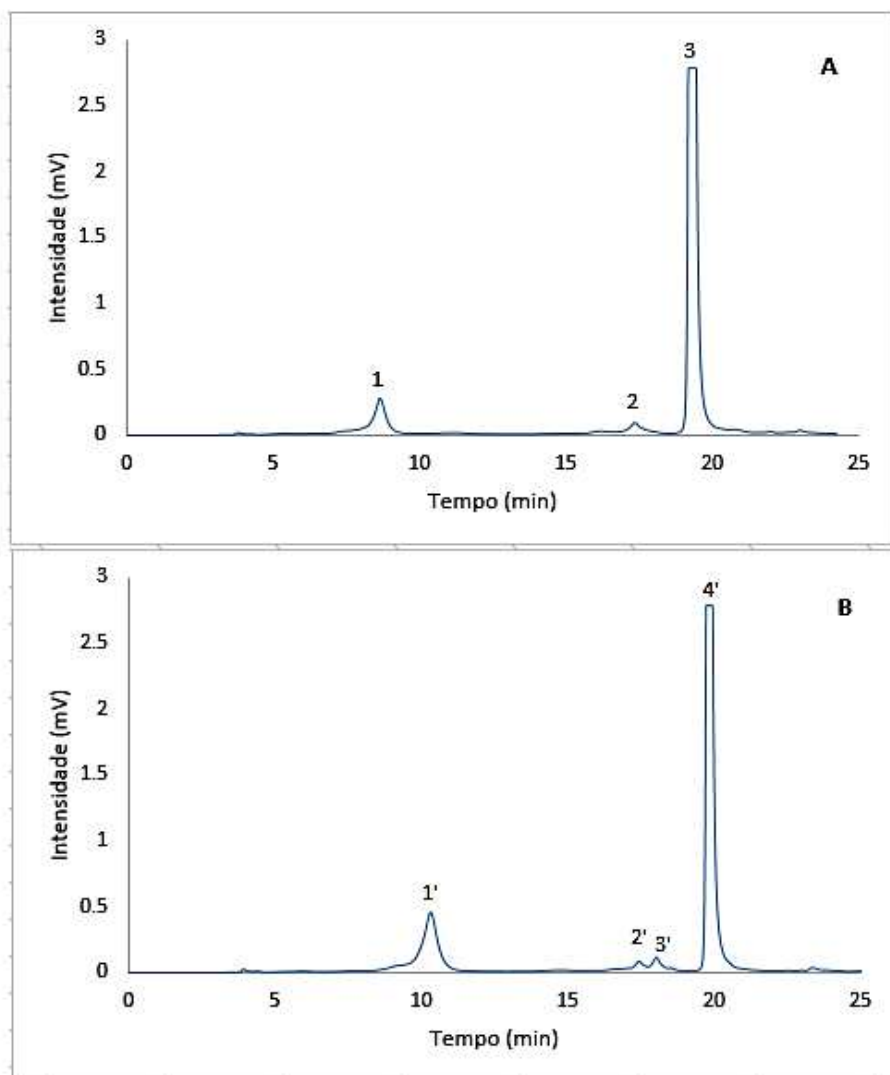


Figura 4. Cromatograma para detecção de catequina e ácidos fenólicos obtido com hidrólise ácida 8M a 285nm (A) e o mesmo cromatograma, mas obtido com hidrólise ácida 4M (B). Identificação dos picos (A): 1) Ácido fenólico desconhecido (8,73 min); 2) Catequina (17,95 min); 3) Ácido fenólico desconhecido (19,4 min). Identificação dos picos (B): 1') Ácido fenólico desconhecido (10,37 min); 2') Desconhecido (17,61 min); 3') Catequina (18,17 min); 4') Ácido fenólico desconhecido (19,9 min).

Posteriormente, com o método alterado de Nuutila et al., (2002) injetou-se novamente as amostras sujeitas a hidrólise ácida 8M e 4M, verificando-se que com a hidrólise ácida 4M havia uma redução da área dos picos.

Contrariamente ao que parece acontecer com os ácidos fenólicos, quanto maior a hidrólise maior a área dos picos dos flavonoides, o que confirma os dados de Licoidiedoff et al. (2013) por demonstrar que após hidrólise ácida, os flavonoides se apresentam sob a forma de aglicona, libertando a parte glicosídica.

Deste modo, a Figura 5 mostra o cromatograma obtido após hidrólise ácida com HCl 8M e a partir do qual se fez a identificação de flavonoides.

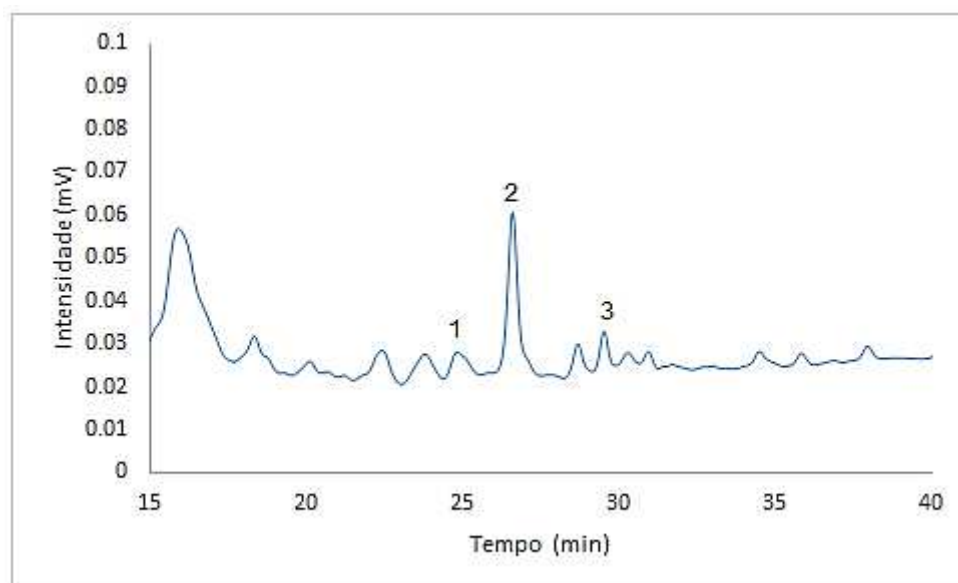


Figura 5. Cromatograma da amostra com hidrólise ácida 8M com método de separação de flavonoides. Identificação dos picos: 1) Rutina (24,96 min); 2) Flavonoide desconhecido (26,6 min); 3) Flavonoide desconhecido (29,6 min).

De modo a perceber quais poderiam ser os flavonoides presentes na amostra, procedeu-se à injeção de padrões de rutina, miricetina, quercitina e kaempferol, de modo a determinar os respetivos tempos de retenção e a recolher os seus espetros (Figura 6). Após injeção, os tempos de retenção registados foram respetivamente 24,62; 28,50; 34,93 e 39,66 minutos.

Contudo, é preciso ter em conta que os espetros dos flavonoides podem variar mediante os grupos funcionais, pois o seu comportamento pode alterar-se em meio ácido e isso tem consequências para os máximos de absorção (Kumar & Pandey, 2013).

Como se pode verificar pela Figura 5, existem picos correspondentes aos tempos de retenção dos padrões testados, embora apenas o espetro do pico 1 (Anexo 6) se assemelhe ao do padrão rutina.

No entanto, embora os tempos de retenção sejam coincidentes, o espectro do pico 1 aparenta ter sofrido uma alteração e uma deslocação do espectro, diferindo sensivelmente do espectro apresentado pelo padrão de rutina.

A rutina é um flavonoide sensível e que poderá sofrer degradação da sua estrutura caso as condições não sejam favoráveis (Carniel et al., 2016), pelo que a hidrólise ácida poderá ter levado à sua degradação (Licodiedoff et al., 2013) e o pico 1 representará apenas uma fração da rutina.

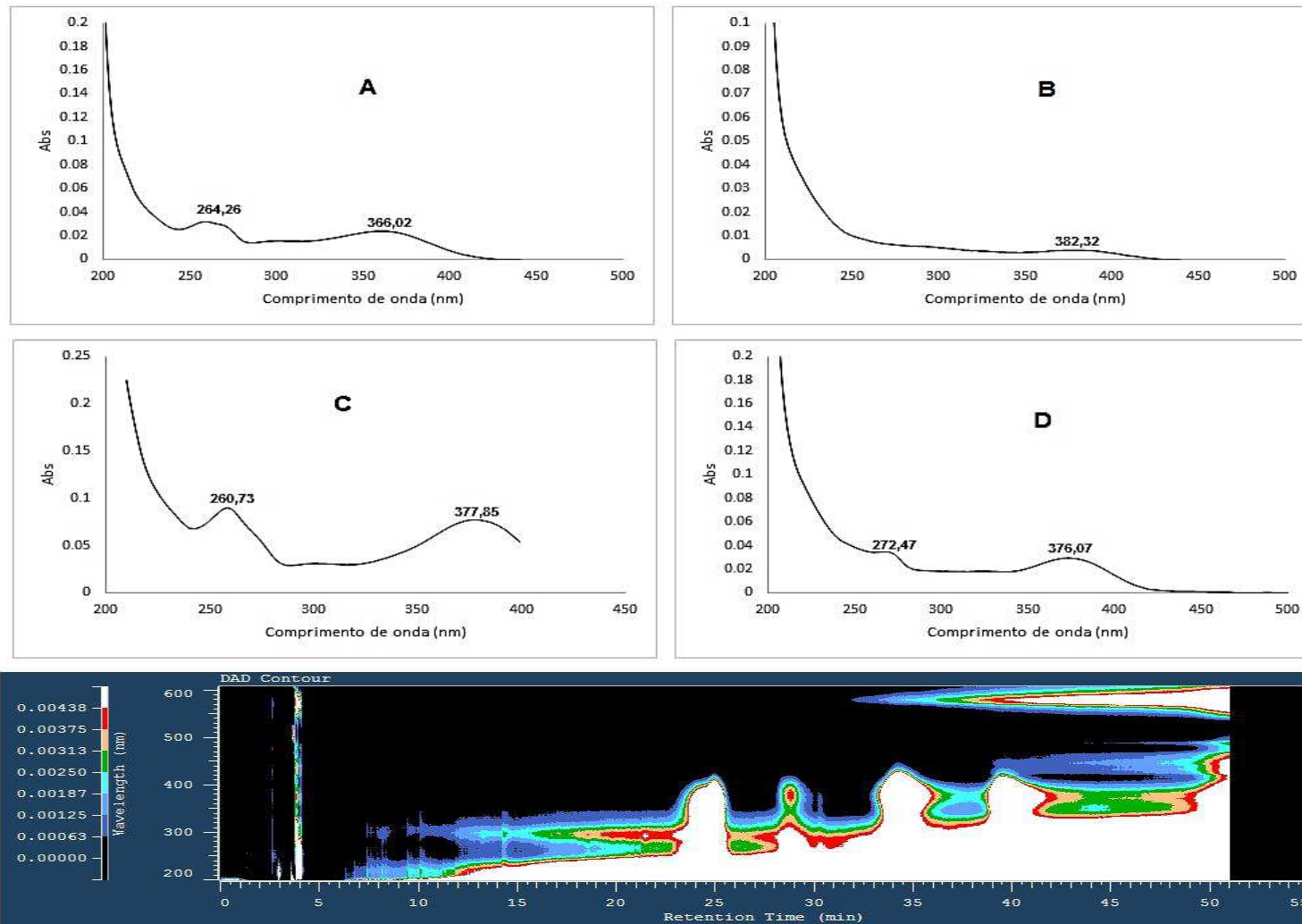


Figura 6. Obtenção de espectros de uma mistura de padrões por DAD, respectivamente a rutina (A), miricetina (B), quercitina (C) e kaempferol (D)

No caso dos picos 2 e 3 da Figura 5, os tempos não coincidem com nenhum dos padrões, mas os espectros por ambos apresentados (Anexo 7 e 8, respetivamente) possuem máximos de absorção na gama de comprimentos de onda a que os flavonoides absorvem.

Estes comprimentos de onda são divididos em dois intervalos onde surgem os dois máximos dos flavonoides. Um dos intervalos situa-se entre os 320 e os 385 nm, surgindo aí um máximo que se deve à presença de um anel benzénico, e o segundo intervalo entre os 250 e os 285 nm, consequência também de um outro anel benzénico (Kumar & Pandey, 2013).

O máximo de absorção do pico 2 é de 334,32 nm (Anexo 7), enquanto o pico 3 apresenta dois máximos de absorção pouco definidos, nos 289,2 nm e nos 343,01 nm, concluindo-se assim que estão presentes flavonoides no extrato metanólico de *Physalis peruviana*.

Após a identificação dos constituintes procedeu-se ao estudo das capacidades antioxidantes dos extratos metanol:água e de hexano e obtiveram-se os valores sintetizados na Tabela 8.

Tabela 8. Concentrações de antioxidante responsáveis pelo poder redutor e inibição de radicais pelos extratos de *physalis* e respetivas percentagens de inibição

Teste antioxidante	Concentração de antioxidante ($\mu\text{moles de trolox/g de } physalis$)		Percentagem de inibição (%)	
	Fenóis	Carotenoides	Fenóis	Carotenoides
FRAP	7,35 (SEM \pm 0,09)	0,84 (SEM \pm 0,01)	-	-
ABTS	4,5 (SEM \pm 1,3)	0,672 (SEM \pm 0,03)	14,3%	11,9%
	Concentração de antioxidante ($\mu\text{g/ml}$)		Percentagem de inibição (%)	
NO \cdot	10,11	13,3	12,8%	33,2%
O $_2\cdot^-$	10,11	40	13,1%	42,4%

5. FRAP

A Figura 7 apresenta a reta de calibração obtida pelas absorvâncias do padrão trolox em função das suas concentrações. Com a aplicação da regressão linear, obteve-se a equação da reta $y = 0,0017x + 0,0139$, com $R^2 = 0,9985$.

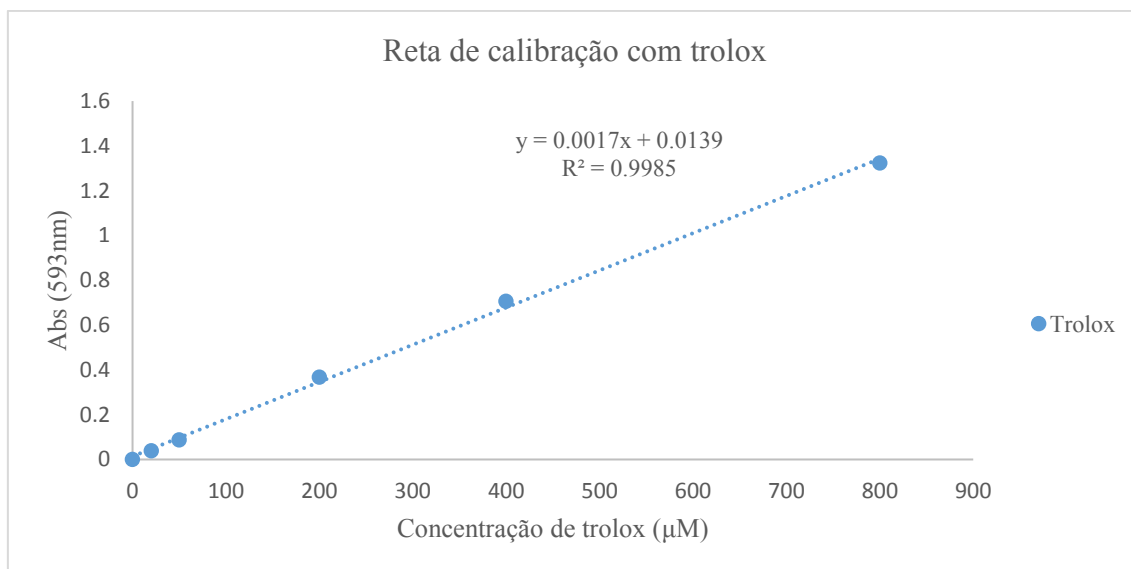


Figura 7. Reta de calibração de trolox para determinação do poder redutor do extrato aquoso e de hexano de *physalis*

Os resultados obtidos para o extrato metanol:água e o extrato de hexano foram, respectivamente, 7,35 µmoles de trolox/g de *physalis* (SEM \pm 0,09) e 0,84 µmoles de trolox/g de *physalis* (SEM \pm 0,01) (Tabela 8).

Estes valores representam as concentrações de antioxidantes que foram capazes de reduzir o complexo de tripiridiltriazina férrico [(FeIII)-TPTZ] ao complexo tripiridiltriazina ferroso [(FeII)-TPTZ] (Karadag et al., 2009).

Deste modo, os resultados sugerem que o poder redutor é mais elevado por parte do extrato fenólico, uma vez que a concentração determinada é superior à do extrato contendo carotenoides.

Relativamente ao extrato metanol:água, os valores estão de acordo com o que Vasco et al. (2008) encontraram, pois para um extrato igual ao preparado neste trabalho, o valor de

fenóis é também inferior a 1 mg de equivalentes de ácido gálico/g de *physalis* e o valor de FRAP encontrado é de 7 μ moles de trolox/g de *physalis*.

Este valor está, tal como na determinação de fenóis, dependente da temperatura, ou seja, quanto mais elevada a temperatura menor a concentração de antioxidantes no extrato metanol:água (López et al., 2013). Este facto corrobora os resultados obtidos, uma vez que indica que os fenóis serão os principais responsáveis pela redução do complexo utilizado no FRAP.

Contudo, a concentração poderá ser otimizada quando calculada em função da massa seca de extrato uma vez que, com o mesmo método de extração, Nárvaez-Cuenca, Mateus-Gómez & Restrepo-Sánchez (2014) obtiveram uma concentração que varia entre 82,9 μ moles de trolox/g de *physalis* e 153,9 μ moles de trolox/g de *physalis*, sendo que este aumento acompanha o processo de maturação da planta.

Comparativamente aos extratos utilizados neste método, o extrato metanólico atinge um valor de concentração de 3,9 μ moles de trolox/g de *physalis*, representando uma concentração inferior ao do extrato metanol:água. Porém, independentemente do extrato, o poder antioxidante da *physalis* é inferior ao de outros frutos, como a manga, romã, goiaba e tomate (Stangeland, Temberg & Lye, 2009).

Em suma, o poder redutor da *physalis* parece estar fortemente ligado à presença de fenóis e ligeiramente à presença de carotenoides, sendo ambos os grupos de moléculas conhecidos pela sua capacidade de combater o stress oxidativo.

6. ABTS

O teste de inibição do radical ABTS foi realizado com o intuito de perceber a capacidade de inibição das amostras estudadas sobre este catião. Na presença de peróxido de hidrogénio ocorre a oxidação desta molécula, formando-se o catião ABTS^{•+} (Karadag et al., 2009) e por isso pretendeu-se verificar se os extratos testados são capazes de reverter o processo oxidativo.

A Figura 8 representa a curva de calibração construída com os vários padrões de trolox e a respetiva equação: $y = 7 \times 10^{-7}x^2 - 0,0015x - 0,7773$, com $R^2 = 0,9997$.

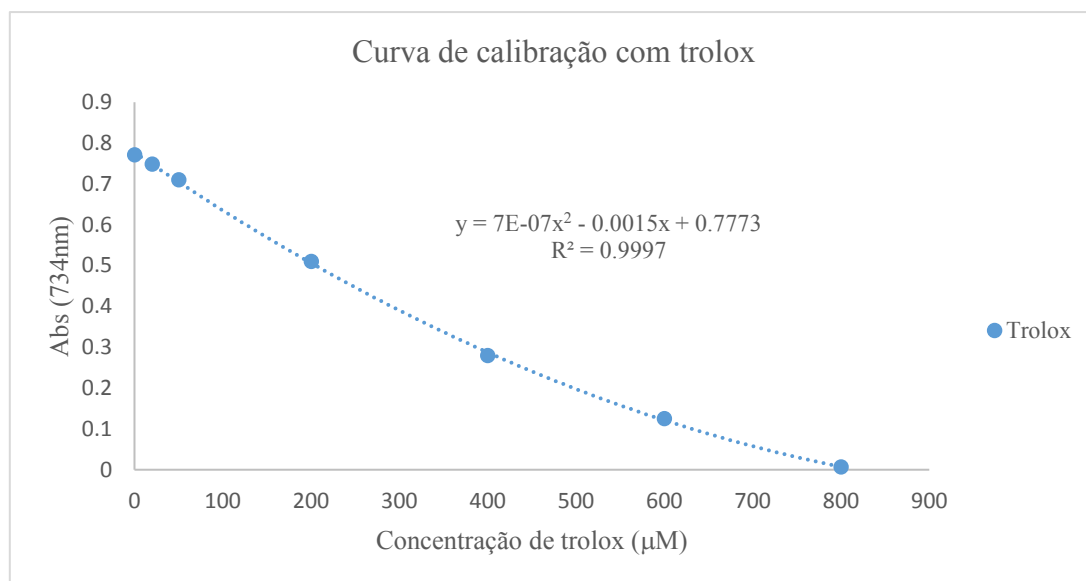


Figura 8. Curva de calibração de trolox para determinação do poder de inibição do extrato aquoso e de hexano de *physalis* sobre o radical ABTS

Os resultados demonstram que o extrato em hexano possui uma concentração de 0,672 µmoles de trolox/g de *physalis* (SEM \pm 0,03), correspondente a uma percentagem de inibição do radical ABTS de 11,9%. Já o extrato metanol:água, numa concentração de 4,5 µmoles de trolox/g de *physalis* (SEM \pm 1,3) chega aos 14,3% de inibição do radical ABTS (Tabela 8).

Estes resultados permitem perceber que os carotenoides, mesmo em menor concentração que os restantes fitoquímicos, possuem forte atividade antioxidante, uma vez que a percentagem de inibição se assemelha à dos fenóis, apresentando estes últimos maior concentração no extrato.

O estudo de Ramadan, El-Ghorab & Ghanem (2016) apresenta valores semelhantes para o extrato metanol:água e para o extrato de hexano, tanto para o FRAP como para o ABTS, corroborando a ideia de que os carotenoides serão principais antioxidantes presentes na *P.peruviana*.

Embora não existam estudos que comprovem esta eficácia antioxidante dos carotenoides presentes na *physalis*, já foi demonstrado que para a concentração de fenóis determinada neste trabalho a concentração de antioxidante capaz de inibir o radical em 50% (IC50) pode atingir os 30 μ moles de trolox/g de *physalis*. No entanto, estes valores são inferiores aos encontrados para outros frutos com potencial antioxidante, como são o açaí, o morango, a goiaba e a manga (Rockenbach et al., 2015).

Os resultados mostram também que existe uma correlação entre os valores de concentração obtidos para o FRAP e para o ABTS, uma vez que o comportamento dos extratos foi semelhante. Este facto foi também comprovado por Vasco et al. (2008), cujo valor de concentração para atingir o IC50 foi aproximadamente 8 μ moles de trolox/g de *physalis*, tal como no teste FRAP (7 μ moles de trolox/g de *physalis*).

Porém, independentemente do teste realizado, os resultados estão dependentes da fase de maturação, pois quanto mais maduro se encontra o fruto maior a concentração de fenóis, o que permite obter o IC50 com uma concentração de 8,67 μ moles de trolox/g de *physalis* (Valdenegro et al., 2012).

Deste modo, mais uma vez se confirma que as *physalis* utilizadas não foram recolhidas no seu estadio máximo de maturação e foram armazenadas em condições indicadas, embora o estudo de Valdenegro et al., (2012) demonstre que estas condições apenas garantem a qualidade do fruto, mas não que se conservem as suas propriedades antioxidantes, motivo pelo qual os resultados obtidos poderão não corresponder ao potencial máximo da *physalis*.

A corroborar estes dados está também o estudo de Narvaez-Cuenca et al., (2014), que apresenta um aumento da capacidade antioxidante concordante com o estadio de maturação face ao radical ABTS, tendo no entanto acrescentado a contribuição da temperatura na extração. Segundo este estudo, a inibição do catião ABTS^{•+} pelos antioxidantes da *physalis* é favorecida pelo aumento de temperatura, que ao obrigar determinados fenóis a alterarem a sua conformação os tornam mais eficazes neste processo.

Relativamente às diluições que foram realizadas, as percentagens de inibição foram mais baixas e por isso não apresentam relevância face ao radical testado.

7. Teste de inibição do radical NO^{*}

Na realização do teste de inibição do radical NO^{*} verificou-se que, relativamente ao extrato de carotenoides, a diluição de 1:3 apresentou maior percentagem de inibição do que a amostra original.

Esta percentagem foi de 33,2% para uma concentração de 13,3 µg de equivalentes de β-caroteno/ml de extrato, contrariamente ao que aconteceu com o extrato metanol:água, onde uma concentração de 10,11 µg de equivalentes de ácido gálico/ml de extrato atingiu um máximo de inibição de 12,8% (Tabela 8).

No entanto, uma vez que as restantes diluições não apresentaram percentagens de inibição significativas, não foi possível contruir uma curva para determinação do IC50.

Num estudo realizado com extrato etanólico a partir da folha de *Physalis minima*, cujo objetivo primário foi o doseamento de fenóis, o IC50 para o radical NO^{*} foi obtido com uma concentração de 46,63 µg/ml de extrato (Karpagasundari & Kulothungan, 2014).

Uma vez que segundo os mesmos autores existirá uma proporcionalidade entre a dose e a percentagem de inibição do radical, poderá estimar-se que os dois extratos utilizados no presente trabalho serão capazes de atingir o IC50 com concentrações inferiores à apresentada por estes investigadores, o que demonstra a elevada capacidade antioxidante da *physalis*.

Na sequência desta suposição, podemos comparar os resultados com os dos autores Vijayalakshmi, Kumar, Priyadarsini & Meenaxshi (2013), que verificaram que o extrato etanólico das folhas de chá verde, conhecida pelo seu elevado poder antioxidante, apresenta um valor de IC50 de 98 µg/ml. Sendo esta uma planta de referência, aqui se demonstra mais uma vez o potencial da *physalis* enquanto um forte antioxidante,

sobretudo devido à percentagem de inibição que se consegue obter com uma concentração tão baixa de carotenoides no extrato de hexano.

Embora sejam necessários mais estudos que testem a atividade dos carotenoides da *physalis* sobre este radical, sabe-se que em macrófagos produtores de óxido nítrico ativados, um extrato de *physalis* rico em *withanolidos* atinge o IC50 com concentrações muito baixas e que, contrariamente ao esperado, um aumento da concentração poderá levar à perda da atividade antioxidante (Guan, Shan, Zhang, Luo & Kong, 2014), tal como se verificou para o extrato de hexano no presente estudo.

8. Teste de inibição do radical $O_2^{\bullet-}$

Contrariamente ao que aconteceu na inibição do radical NO^{\bullet} , a concentração em equivalentes de β -caroteno que mais inibiu o radical superóxido foi a de 40 $\mu\text{g/ml}$ de extrato. Com este valor de concentração a inibição do radical foi de 42,4%, ou seja, foi o valor máximo de inibição conseguido. No caso do extrato metanol:água, os fenóis 10,11 $\mu\text{g/ml}$ inibiram o radical superóxido em 13,1% e as restantes diluições também não obtiveram percentagens de inibição significativas (Tabela 8).

Tal como para o teste de inibição do radical NO^{\bullet} , não foi possível calcular o IC50 para o radical $O_2^{\bullet-}$, embora o extrato de hexano se tenha aproximado do valor..

Contudo, o estudo de Cheng, Li, Meng, Hon & Wu (2008) que um extrato de *physalis* concebido para obter os seus polissacarídeos e fenóis, atingiu uma percentagem de inibição do radical de 22,1%. O estudo demonstra ainda que mesmo aumentando a concentração do extrato, a percentagem de inibição mantém-se estável neste valor, o que poderá demonstrar as limitações da *physalis* no que respeita à inibição do radical $O_2^{\bullet-}$.

No entanto, um estudo realizado com mirtilos, cujo objetivo incide na capacidade de inibição dos flavonoides sobre este radical, verificou-se a existência de uma relação dose dependente até às 300 $\mu\text{g/ml}$, sendo que o IC50 foi de 214,83 $\mu\text{g/ml}$ (Wu et al., 2015).

Neste sentido, os resultados deste trabalho demonstram novamente a probabilidade do IC50 ser atingido com uma menor concentração antioxidante da *P.peruviana*, mostrando o potencial desta espécie face a outras já tão bem estudadas.

Assim, os resultados apontam para um grande potencial antioxidante por parte dos carotenoides, embora não seja tão evidente como no caso do óxido nítrico. Porém, os carotenoides continuam a evidenciar-se como os principais responsáveis pela atividade antioxidante da *physalis*.

Conclusão

Com a presente monografia foi possível integrar informação sobre as origens da *physalis*, a sua composição e os principais fatores que influenciam a sua contribuição benéfica para a saúde.

Neste contexto, a pesquisa bibliográfica realizada permitiu compreender os mecanismos pelos quais a *physalis* beneficia a saúde, destacando-se os mecanismos antioxidantes, anti-inflamatórios e genéticos, que desenvolvem um papel importante em doenças como o cancro, a diabetes, a hipercolesterolemia e as doenças do foro nervoso.

De acordo com esta pesquisa, os resultados desta investigação conduziram à conclusão de que a *physalis* é uma fruta rica em variados fitoquímicos, com propriedades antioxidantes, pelo que é necessário fazer uso das suas propriedades. Estas propriedades antioxidantes são resultado da presença de fenóis, especificamente flavonoides, e carotenoides, cujo mecanismo se baseia sobretudo na capacidade de reduzir complexos oxidantes ou inibir radicais livres.

Na base desta atividade estão os ácidos fenólicos, a catequina, vários flavonoides e o β -caroteno, como demonstrado neste trabalho experimental. A catequina mostrou especial mas é necessário continuar a investigação para identificação de mais constituintes e a fazer a sua quantificação.

No entanto, a sensibilidade da *physalis* às condições do meio envolvente é elevada, pelo que para obter o máximo rendimento da planta é necessário que nos próximos trabalhos se estudem as condições de desenvolvimento da planta e se definiam limites para parâmetros como a temperatura, luz, altitude e humidade.

Da mesma forma, a presença ou não de constituintes está dependente do solvente extrator e do tipo de extração, pelo que também no decorrer destes procedimentos é necessário perceber quais as melhores e mais potentes condições de extração e posterior conservação.

Apesar de terem sido identificadas as propriedades antioxidantes da *physalis*, ainda pouco se sabe sobre a sua atividade farmacológica devido à escassez de estudos clínicos, pelo que futuros trabalhos deverão investir na experimentação de extratos da *physalis* em humanos.

Contudo, é importante notar que a *physalis* é utilizada há muito tempo pelas populações, que empiricamente comprovam os seus benefícios, reforçando a ideia de que é necessário investir no desenvolvimento de formas farmacêuticas que permitam usufruir desta planta.

A caracterização experimental da *Physalis* comercializada em Portugal revelou que os constituintes e a sua actividade antioxidante são consistentes com os valores apresentados noutros trabalhos.

Assim, a *physalis* revelou ser uma planta com grande potencial para benefício da saúde, tendo por base a atividade antioxidante e uma vasta constituição. Por isso deverá ser feito mais investimento na investigação das suas potencialidades, de modo a poder aproveitá-las em benefício da saúde humana.

Referências Bibliográficas

Akram, M., Usmanghani, K., Ahmed, I., Azhar, I. e Hamid, A. (2014). Comprehensive review on therapeutic strategies of gouty arthritis. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(5), 1575-1582.

Alkhalidy, H., Moore, W., Zhang, Y., McMillan, R., Wang, A., Ali, M., ... Liu, D. (2015). Small molecule kaempferol promotes insulin sensitivity and preserved pancreatic β -cell mass in middle-aged obese diabetic mice. *Journal of Diabetes Research*, 2015, 1-15.

Angamuthu, J., Ganapathy, M., Evanjelene, V.K., Ayyavuv, N. e Padamanabhan, V. (2014). Evaluation of phytochemical analysis and antimicrobial activity of leaf and fruit extracts of *Physalis minima*. *International Journal of Emerging Technology and Advanced Engineering*, 4(1), 462-465.

Ankrah, N., Nyarko, A. K., Addo, P. G. A., Ofosuhene, M., Dzokoto, C., Marley, E., ... Ekuban, F. A. (2003). Evaluation of efficacy and safety of a herbal medicine used for the treatment of malaria. *Phytoteraphy Research*, 17(6), 97-701.

Angst, E., Park, J. L., Moro, M., Lu, Q., Lu, X., Li, G., ... Hines, O. J. (2013). The flavonoid quercetin inhibits pancreatic cancer growth *in vitro* and *in vivo*. *Pancreas*, 42(2), 223-229.

Briones-Labarca, V., Giovagnoli-Vicuña, C., Figueroa-Alvarez, P., Quispe-Fuentes, I. e Pérez-Won, M. (2013). Extraction of β -carotene, vitamin C and antioxidant compounds from *Physalis peruviana* (Cape Gooseberry) assisted by high hydrostatic pressure. *Food and Nutrition Sciences*, 4, 109-118.

Bourdy, G., DeWalt, S. J., Michel L. R. C., Roca, A., Deharo, E., Muñoz, V., ... Gimenez, A. (2000). Medicinal plants uses of the Tacana, an Amazonian Bolivian ethnic group. *Journal of Ethnopharmacology*, 70(2), 87-109.

Bravo, K., Alzate, F. e Osorio, E. (in press). Fruits of selected wild and cultivated Andean plants as sources of potential compounds with antioxidant and anti-aging activity. *Industrial Crops and Products*.

Carniel, N., Dallago, R. M., Dariva, C., Bender, J. P., Nunes, A. L., Zanella, O., ... Priamo, W. L. (2016). Microwave-assisted extraction of phenolic acids and flavonoids from *physalis angulata*. *Journal of Food Process Engineering*, 1, 1-16.

Cheng, Y., Li, L., Meng, Z., Hou, A., Wu, Y. e Teng, L. (2008). Component analysis and free radical scavenging activity of *Physalis alkekengi* L. polysaccharide. *Chemical Research in Chinese Universities*, 24(2), 167-170.

Cedeño, M. e Montenegro, D. (2004). *Plan exportador, logístico y comercialización de uchuva al mercado de Estados Unidos para FRUTEXPO SCI Ltda* (Dissertação de Licenciatura). Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá.

Csepanyi, E., Czompa, A., Haines, D., Lekli, I., Bakondi, E., Balla, G., ... Bak, I. (2015). Cardiovascular effects of low versus high-dose beta-carotene in a rat model. *Pharmacological Research*, 100, 148-156.

Du, G., Lin, H., Yang, Y., Zhang, S., Wu, X., Wang, M., ... Han, G. (2010). Dietary quercetin combining intratumoral doxorubicin injection synergistically induces rejection of established breast cancer in mice. *International Immunopharmacology*, 10(7), 819-826.

El-Dermerdash, F. M., Yousef, M. I., Kedwany, F. S. e Baghdadi, H. H. (2004). Cadmium-induced changes in lipid peroxidation, blood hematology, biochemical parameters and semen quality of male rats: protective role of vitamin E and β -carotene. *Food and Chemical Toxicology*, 42(10), 1563-1571.

Eliassen, A. H., Liao, X., Rosner, B., Tamimi, R. M., Tworoger, S. S. e Hankinson, S. E. (2015). Plasma carotenoids and risk of breast cancer over 20 y of follow-up. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 101(6), 1197-1205.

- Fischer, G., Almanza-Merchán, P. J. e Miranda, D. (2014). Importancia y cultivo de la Uchuva (*Physalis peruviana* L.). *Revista Brasileira de Fruticultura*, 36(1), 1-15.
- Gallagher, R. J., Subramanian, C., Grogan, P. T., Kindscher, K., Cao, C., Zhang, H., ... Timmermann, B. N. (2015). The therapeutic potential of *Physalis longifolia* against various carcinomas. *PharmaNutrition*, 3(4), 146-152.
- Gautam, S. K., Dwivedi, D. H. e Kumar, P. (2015). Preliminary studies on bioactive phytochemicals in extract of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) fruits and their products. *Journal of Pharmacology and Phytochemistry*, 3(5), 93-95.
- Guan, Y., Shan, S., Zhang, W., Luo, J. e Kong, L. (2015). Withanolides from *Physalis minima* and their inhibitory effects on nitric oxide production. *Steroids*, 82, 38-43.
- Guo, J., Meng, Y., Zhao, Y., Hu, Y., Ren, D. e Yang, X. (2015). Myricetin derived from *Hovenia dulcis* Thunb. ameliorates vascular endothelial dysfunction and liver injury in high choline-fed mice. *Food & Function*, 6(5), 1620-1634.
- Hassan, A. I. e Ghoneim, A. M. (2013). A possible inhibitory effect of physalis (*Physalis pubescens* L.) on diabetes in male rats. *World Applied Sciences Journal*, 21(5), 681-688.
- Hassanien, M. F. R. (2011). *Physalis peruviana*: A rich source of bioactive phytochemicals for functional foods and pharmaceuticals. *Food Reviews International*, 27(3), 259-273.
- Hattiwale, S. H., Saha, S., Yendigeri, S. M., Jargar, J. G., Dhundasi, S. A. e Das, K. K. (2013). Protective effect of L-ascorbic acid on nickel induced pulmonary nitrosative stress in male albino rats. *Biometals*, 26(2), 329-336.
- He, H., Zhang, L., Feng, Y., Wang, J., Liu, W., Chen, L., ... Ikejima, T. (2013). Physalin A induces apoptotic cell death and protective autophagy in HT1080 human fibrosarcoma cells. *Journal of Natural Products*, 76(5), 880-888.

- Huang, C., Xu, Q., Chen, C., Song, C., Xu, Y., Xiang, Y., ... Jiang, H. (2013). The rapid discovery and identification of physalins in the calyx of *Physalis alkekengi* L.var.*franchetii* (Mast.) Makino using ultra-highperformance liquid chromatography–quadrupole time of flight tandem mass spectrometry together with a novel three-step datamining strategy. *Journal of Chromatography A*, 1361, 139-152.
- Hsu, C., Wu, Y., Farh, L., Du, Y., Tseng, W., Wu, C., ... Chang, F. (2012). Physalin B from *Physalis angulata* triggers the NOXA-related apoptosis pathway of human melanoma A375 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 50(3-4), 619-624.
- Islam, M. K., Saha, S., Mohamad, K., Awang, K., Uddin, S. J., Rahman, M. M., ... Shilpi, J.A. (2014). An ethnobotanical study of medicinal plants used by tribal and native people of Madhupur forest area, Bangladesh. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(2), 921-930.
- Ji, L., Yuan, Y., Luo, L., Chen, Z., Ma, X., Ma, Z. e Cheng, L. (2012). Physalins with anti-inflammatory activity are present in *Physalis alkekengi* var. *franchetii* and can function as Michael reaction acceptors. *Steroids*, 77(5), 441-447.
- Jung, E. S., Park, H. M., Lee, K., Shin, J., Mun, S., Kim, J. K., ... Lee, C. H. (2014). A metabolomics approach shows that catechin-enriched green tea attenuates ultraviolet B induced skin metabolite alterations in mice. *Metabolomics*, 11(4), 861-871.
- Kang, H., Kwon, S. e Choi, H. (2011). Inhibitory effect of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* extract and its chloroform fraction on LPS or LPS/IFN- γ stimulated inflammatory response in peritoneal macrophages. *Journal of Ethnopharmacology*, 135(1), 95-101.
- Karadag, A., Ozcelik, B. e Saner, S. (2009). Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities. *Food Analytical Methods*, 2(1), 41-60.
- Karpagasundari, C. e Kulothungan, S. (2014). Free radical scavenging activity of *Physalis minima* Linn. leaf extract (PMLE). *Journal of Medicinal Plants Studies*, 2(4), 59-64.

Kasperczyk, S., Dobrakowski, M., Kasperczyk, J., Ostalowska, A., Zalejska-Fiolka, J. e Birkner, E. (2014). Beta-carotene reduces oxidative stress, improves glutathione metabolism and modifies antioxidant defense systems in lead-exposed workers. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 280(1), 36-41.

Kawada, H., Kaneko, M., Sawanobori, M., Uno, T., Matsuzawa, H., Nakamura, Y., ... Ando, K. (2013). High concentrations of L-ascorbic acid specifically inhibit the growth of human leukemic cells via downregulation of HIF-1 α transcription. *PloS One*, 8(4), 1.

Kong, L., Luo, C., Li, X., Zhou, Y. e He, H. (2013). The anti-inflammatory effect of kaempferol on early atherosclerosis in high cholesterol fed rabbits. *Lipids in Health and Disease*, 12, 1-12.

Kour, K., Pandey, A., Suri, K. A., Satti, N. K., Gupta, K. K. e Bani, S. (2009). Restoration of stress-induced altered T cell function and corresponding cytokines patterns by Withanolide A. *International Immunopharmacology*, 9(10), 1137-1144.

Kowalski, R. e Wolski, T. (2003). Evaluation of phenolic acid content in *Silphium perfoliatum* L. leaves, inflorescences and rhizomes. *Electronic Journal of Polish Agricultural Universities*, 6(1). Disponível em: <http://www.ejpau.media.pl/volume6/issue1/horticulture/art-03.html>

Kuboyama, T., Thoda, C. e Komatsu, K. (2005). Neuritic regeneration and synaptic reconstruction induced by withanolide A. *British Journal of Pharmacology*, 144(7), 961-971.

Kumar, G., Jayanand, Perween, Q., Ansari, R. e Rai, D. V. (2014). Neuroprotective effects of rutin against hydrogen peroxide induced oxidative stress in cerebral glioma cell line. *International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research*, 25(2), 304-308.

Kumar, S. e Pandey, A., K. (2013). Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. *The Scientific World Journal*, 2013, 1-16.

Li, X., Zhao, J., Yang, M., Liu, Y., Li, Z., Li, R., ... Yang, S. (2014). Physalins and withanolides from the fruits of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* (Mast.) Makino and the inhibitory activities against human tumor cells. *Phytochemistry Letters*, 10, 95-100.

Licodiedoff, S., Koslowski, L.A.D. e Ribani, R.H. (2013). Flavonol rates of gosseberry fruits *Physalis peruviana* determined by HPLC through the optimization and validation of the analytic method. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, 3(1), 1-6.

Lima, M.S., Evangelista, A.F., Santos, G.G.L., Ribeiro, I.M., Tomassini, T.C.B., Soares, M.B.P. e Villareal, C.F. (2014). Antinociceptive Properties of Physalins from *Physalis angulata*. *Journal of Natural Products*, 77(11), 2397-2403.

López, J., Vega-Gálvez, A., Torres, M. J., Lemus-Mondaca, R., Quispe-Fuentes¹, I. e Scala, K. (2013). Effect of dehydration temperature on physico-chemical properties and antioxidante capacity of goldenberry (*Physalis peruviana* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research*, 73(3), 293-300.

Ma, Y., Han, W., Li, J., Hu, L. e Zhou, Y. (2015). Physalin B not only inhibits the ubiquitin-proteasome pathway but also induces incomplete autophagic response in human colon cancer cells *in vitro*. *Acta Pharmacologica Sinica*, 36(4), 517-527.

Maoebe, M.A.G, Gitu, L., Gatebe, E. e Rotich, H. (2012). Phytochemical analysis of phenol and flavonoid in eight selected medicinal herbs used for the treatment of diabetes, malaria and mneumonia in Kisii, Kenya. *Academic Journal of Cancer Research*, 5(2), 31-39.

Medina-Medrano, J. R., Almaraz-Abarca, N., Gonzalez-Elizondo, M. S., Uribe-Soto, J. N., Gonzalez-Valdez, L. S. e Herrera-Arrieta, Y. (2015). Phenolic constituents and antioxidante properties of five wild species of *Physalis* (Solanaceae). *Botanical Studies*, 56(24), 1-12.

Moneim, A. E. A., Bauomy, A. A., Diab, M. M. S., Shata, M. T. M., Al-Olayan, E. M. e El-Khadragy, M. F. (2014). The protective effect of *Physalis peruviana* L. against cadmium-induced neurotoxicity in rats. *Biological Trace Element Research*, 160(3), 392-399.

Moretti, M., Budni, J., Santos, D. B., Antunes, A., Daufenbach, J. F., Manosso, L. M., ... Rodrigues, A. L. S. (2013). Protective effects of ascorbic acid on behavior and oxidative status of restraint-stressed mice. *Journal of Molecular Neuroscience*, 49(1), 68-79.

Namiesnik, J., Vearalsip, K., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Ham, K., Kang, S., ... Goristein, S. (2014). Comparative assessment of two extraction procedures for determination of bioactive compounds in some berries used for daily food consumption. *International Journal of Food Science and Technology*, 49(2), 337-346.

Narasimhan, A., Chinnayan, M. e Karundevi, B. (2015). Ferulic acid exerts its antidiabetic effect by modulating insulin signalling 1 molecules in the liver of high fat diet and fructose – induced type-2 diabetic adult male rat. *Applied Physiology, Nutrition and Metabolism*, 40(8), 769-781.

Narváez-Cuenca, C. E., Mateus-Gómez, A e Restrepo-Sánchez, L. P. (2014). Antioxidant capacity and total phenolic content of air-dried cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) at different ripeness stages. *Postharvest Physiology and Technology*, 32(2), 232-237.

Nathya, M e Dorcus, D. (2012). Preliminary phytochemical and anti-bacterial studies on *Physalis minima* Linn. *International Journal of Current Science*, 1, 24-30.

Nikkhah, E., Khayami, M. e Heidari, R. (2008). In vitro screening for antioxidant activity and cancer suppressive effect of blackberry (*Morus Nigra*). *Iranian Journal of Cancer Prevention*, 4, 167-172.

Nogata, Y., Ohta, H., Yoza, K., Berhow, M. e Hasegawa, S. (1994). High-performance liquid chromatographic determination of naturally occurring flavonoids in Citrus with a photodiode-array detector. *Journal of Chromatography A*, 667(1-2), 59-66.

Nogueira, R. C., Rocha, V. P. C., Nonato, F. R., Tomassini, T. C. B., Ribeiro, I. M., Santos, R. R. e Soares, M. B. P. (2013). Genotoxicity and antileishmanial activity evaluation of *Physalis angulata* concentrated ethanolic extract. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 36(3), 1304-1311.

Nuutila, A. M., Kammiovirta, K. e Oksman-Kaldentey, K., M. (2002). Comparison of methods for the hydrolysis of flavonoids and phenolic acids from onion and spinach for HPLC analysis. *Food Chemistry*, 76(4), 519-525.

Ooi, K.L., Muhammad, T.S.T. e Sulaiman, S.F. (2010). Growth arrest and induction of apoptotic and non-apoptotic programmed cell death by, *Physalis minima* L. chloroform extract in human ovarian carcinoma Caov-3 cells. *Journal of Ethnopharmacology*, 128(1), 92-99.

Ooi, K.L., Muhammad, T.S.T. e Sulaiman, S.F. (2013). Physalin F from *Physalis minima* L. triggers apoptosis-based cytotoxic mechanism in T-47D cells through the activation caspase-3 and c-myc dependente pathways. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(1), 382-388.

Othman, M. S., Nada, A., Zaki, H. S. e Moneim, A. E. A. (2014). Effect of *Physalis peruviana* L. on cadmium-induced testicular toxicity in rats. *Biological Trace Element Research*, 159(1-3), 278-287.

Pinto, N.B., Morais, T.C., Carvalho, K.M.B., Silva, C.R., Andrade, G.M., Brito, G.A.C., ... Santos, F.A. (2010). Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. *Phytomedicine*, 10(17), 140-143.

Prabha, M. R. e Vasantha, K. (2011). Antioxidant, cytotoxicity and polyphenolic content of *Calotropis procera* (Ait.) R. Br. flowers. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 1(7), 136-140.

Pradhananga, S. e Shim, W. (2015). Caffeic acid exhibits anti-pruritic effects by inhibition of multiple itch transmission pathways in mice. *European Journal of Pharmacology*, 762, 313-321.

Pragasam, S. J., Venkatesan, V. e Rasool, M. (2013). Immunomodulatory and anti-inflammatory effect of p-coumaric acid, a common dietary polyphenol on experimental inflammation in rats. *Inflammation*, 36(1), 169-176.

Puente, L.A., Pinto-Muñoz, C.A., Castro, E.S. e Cortés, M. (2011). *Physalis peruviana* Linnaeus, the multiple properties of a highly functional fruit: A review. *Food Research International*, 44(7), 1733-1740.

Raju, P. e Mamidala, E. (2015). Anti-diabetic activity of compound isolated from *Physalis angulata* fruit extracts in alloxan induced diabetic rats. *The American Journal of Science and Medical Research*, 1(1), 53-60.

Ramadan, M. F. e Mörsel, J. T. (2003). Oil goldenberry (*Physalis peruviana* L.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(4), 969–974.

Ramadan, M. F. e Mörsel, J. T. (2004). Goldenberry, a novel fruit source of fat-soluble bioactives. *Novel Crop Production*, 15(2), 130-131.

Ramadan, M. F., Hassan, N. A., Elsanhoty, R. M. e Sitohy, M. Z. (2012). Goldenberry (*Physalis peruviana*) juice rich in health-beneficial compounds suppresses high-cholesterol diet-induced hypercholesterolemia in rats. *Journal of Food Biochemistry*, 37(6), 708-722.

Ramadan, M. M., El-Ghorab, A. H. e Ghanem, K. Z. (2016). Volatile compounds, antioxidants, and anticancer activities of Cape gooseberry fruit (*Physalis peruviana* L.): an *in-vitro* study. *Journal of the Arab Society of Medical Research*, 10(2), 56-64.

Richetti, S. K., Blank, M., Capiotti, K. M., Piato, A. L., Rogo, M. R., Vianna, M. R. e Bonan, C. D. (2011). Quercetin and rutin prevent scopolamine-induced memory impairment in Zebrafish. *Behavioural Brain Research*, 217(1), 10-15.

Romero-Cerecero, O., Reyes-Morales, H., Aguilar-Santamaría, L., Herta-Reyes, M. e Tortoriello-Garcia, J. (2009). Use of medicinal plants among patients with diabetes mellitus type 2 in Morelos, Mexico. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 8(5), 380–388.

Rockenbach, I. I., Rodrigues, E., Cataneo, C., Gonzaga, L. V., Lima, A., Mancini-Filho, J. e Fett, R. (2008). Ácidos fenólicos e atividade antioxidante em fruto de *Physalis peruviana* L. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 19(3), 271-276.

Rop, O., Micek, J., Jurikova, T. e Valsikova, M. (2012) Bioactive content and antioxidant capacity of cape gooseberry fruit. *Central European Journal of Biology*, 7(2), 672-679.

Rosso, V.V. e Mercadante, A.Z. (2007). Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from amazonian fruits. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5062-5072.

Rosa, P. B., Neis, V. B., Ribeiro, C. M., Moretti, M. e Rodrigues, A. L. S. (2016). Antidepressant-like effects of ascorbic acid and ketamine involve modulation of GABA_A and GABA_B receptors. *Pharmacological Reports*, 68(5), 996-1001.

Sarada, S. K. S., Dipti, P., Anju, B., Pauline, T., Kain, A. K., Sharma, S. K., ... Selvamurthy, w. (2002). Antioxidant effect of beta-carotene on hypoxia induced oxidative stress in male albino rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 79(2), 146-153.

Sathyadevi, M. e Subramanian, S. (2015). Extraction, isolation and characterization of bioactive flavonoids from the fruits of *Physalis peruviana* Linn extract. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8(1), 152-157.

Schwingel, T. E., Klein, C. P., Nicoletti, N. F., Dora, C. L., Hadrich, G., Bica, C. G., ... Morrone, F. B. (2014). Effects of the compounds resveratrol, rutin, quercetin, and

quercetin nanoemulsion on oxaliplatin-induced hepatotoxicity and neurotoxicity in mice. *Naunyn-Schmiedebergs Archives of Pharmacology*, 387(9), 837-848.

Shahid, A., Ali, R., Ali, N., Hasan, S. K., Bernwal, P., Mohammad, S., ... Sultana, S. (2016). Modulatory effects of catechin hydrate against genotoxicity, oxidative stress, inflammation and apoptosis induced by benzo(a)pyrene in mice. *Food Chemistry and Toxicology*, 92, 64-94.

Silva, M.T.G, Simas, S.M., Batista, T.G.F.M., Cardarelli, P. e Tomassini, T.C.B. (2005). Studies on antimicrobial activity, in vitro, of *Physalis angulata* L. (Solanaceae) fraction and physalin B bringing out the importance of assay determination. *Memórias do Insitituto Oswaldo Cruz*, 100(7), 779-782.

Silva, D. F., Pio, R., Soares, J. D. R., Elias, H. H. S., Villa, F. e Boas, E. V. B. V. (2016). Light spectrum of the quality of fruits of physalis species in subtropical área. *Bragantia*, 75(3), 1-6.

Soares, M. B. P., Brustolim, D., Santos, L. A., Bellintani, M. C., Paiva, F. P., Ribeiro, Y. M., ... Santos, R. R. (2006). Physalins B, F and G, seco-steroids purified from *Physalis angulata* L., inhibit lymphocyte function and allogeneic transplant rejection. *International Immunopharmacology*, 6(3), 408-414.

Stangeland, T., Remberg, S. F. e Lye, K. A. (2009). Total antioxidant activity in 35 Ugandan fruits and vegetables, *Food Chemistry*, 1(1), 85-91.

Susanti, R. F., Kurnia1, K., Vania1, A. e Reynaldo, I. J. (2015). Total phenol, flavanoid and antioxidant activity of *Physalis angulata* leaves extract by subcritical water extraction. *Modern Applied Science*, 9(7), 190-198.

Sutrisna, E. M., Indwianastuti e Haryadi (2012, Junho). *The ethanol extract of Physalis angulata Linn inhibits COX-2 activity in MCF-7 cell in vitro*. Comunicação apresentada na conferência internacional Research and Application on Traditional Complementary and Alternative Medicine in Health Care (TCAM), Surakarta.

Taj, D. Khan, H., Sultana, V., Ara, J. e Ehteshamul-Haque, S. (2014). Antihepatotoxic effect of golden berry (*Physalis peruviana* Linn.) in carbon tetrachloride (CCl₄) intoxicated rats. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 27(3), 491-494.

Tapia, M. e Fries, A. (2007). *Guía de campo de los cultivos andinos*. Lima, Perú: FAO y ANPE.

Thaipong, K., Cisneros-Zevallos, L., Boonprakob, U., Crosby, K. e Byrne, D. H. (2006). Comparison of ABTS, DPPH, FRAP, and ORAC assays for estimating antioxidant activity from guava fruit extracts. *Journal of Food Composition and Analysis*, 19, 669-675.

Tsai, Y. e Chen, B. (2016). Preparation of catechin extracts and nanoemulsions from green tea leaf waste and their inhibition effect on prostate cancer cell PC-3. *International Journal of Nanomedicine*, 11, 1907-1926.

Usaizan, N., Abdullah, N.A.P., Ahmad, S.H. e Saleh, G. (2014). Preliminary phytochemical screening and GC-MS analysis of ethanol extract of *Physalis Minima* L. (Solanaceae). *Journal of Advanced Agricultural Technologies*, 1(2), 100-103.

Valdenegro, M., Fuentes, L., Herrera, R., Moya-León, M. A. (2012). Changes in antioxidant capacity during development and ripening of goldenberry (*Physalis peruviana* L.) fruit and in response to 1-methylcyclopropene treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 67, 110-117.

Vandenbergh, I., Créancier, L., Vispé, S., Annereau, J.P., Barret, J.M, Pouny, I., ... Kruczynski, A. (2008). Physalin B, a novel inhibitor of the ubiquitin-proteasome pathway, triggers NOXA-associated apoptosis. *Biochemical Pharmacology*, 76(4), 453-462.

Vasco, C., Ruales, J. e Kamal-Eldin, A. (2008). Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry*, 111(4), 816-823.

Vijayalakshmi, A., Kumar, P. R., Priyadarsini, S. S. e Meenaxshi, C. (2013). *In vitro* antioxidant and anticancer activity of flavonoid fraction from the aerial parts of *Cissus quadrangularis* Linn. against human breast carcinoma cell lines, *Journal of Chemistry*, 2013, 1-9.

Wein, S., Schrader, E., Rimbach, G. e Wolffram, S. (2013). Oral green tea catechins transiently lower plasma glucose concentrations in female db/db mice. *Journal of Medicinal Food*, 16(4), 1-6.

Wu, S., Ng, L., Chen, C., Lin, D., Wang, S. e Lin, C. (2004). Antihepatoma activity of *Physalis angulata* and *P. peruviana* extracts and their effects on apoptosis in human Hep G2 cells. *Life Sciences*, 74(16), 2061-2073.

Wu, S., Chang, S., Lin, D., Wang, S., Hou, F. e Ng, L. (2009). Supercritical carbon dioxide extract of *Physalis peruviana* induced cell cycle arrest and apoptosis in human lung cancer H661 cells. *Food and Chemical Toxicology*, 47(6), 1132-1138.

Wu, P., Ma, G., Li, N., Deng, Q., Yin, Y. e Huang, R. (2015). Investigation of *in vitro* and *in vivo* antioxidant activities of flavonoids rich extract from the berries of *Rhodomyrtus tomentosa*(Ait.) Hassk. *Food Chemistry*, 173, 194-202.

Xu, B., Ju., C., Guan, H., Xu, L. e Wang, B (2012). High-performance liquid chromatography (HPLC) determination of five active ingredients in the calyces of *Physalis Alkekengi* L. var. *franchetii* (mast.) Mskino. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(12), 2438-2442.

Yan, J., Jung, J., Kim, T., Hasan, A., Hong, C., Nam, J. e Song, D. (2013). Protective effects of ferulic acid in amyloid precursor protein plus presenilin-1 transgenic mouse model of Alzheimer disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 36(1), 140-143.

Yilmaztekin, M. (2014). Analysis of volatile components of cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) grown in Turkey by HS-SPME and GC-MS. *The Scientific World Journal*, 2014, 1-8.

Yldiz, G., Izli, N., Unal, H., e Uylaser, V. (2015). Physical and chemical characteristics of goldenberry fruit (*Physalis peruviana* L.). *Journal of Food Science and Technology*, 52(4), 2320-2327.

Yoon, S., Kang, S., Shin, H., Kang, S., Kim, J., Ko, H. e Kim, S. (2013). p-Coumaric acid modulates glucose and lipid metabolism via AMP-activated protein kinase in L6 skeletal muscle cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 432(4), 553-557.

Yu, H. H., Liu, X.G., Xing, R.E., Liu, S. Guo, Z.Y., Wang, P.B.... Li, P.C. (2006). In vitro determination of antioxidant activity of proteins from jellyfish *Rhopilema esculentum*. *Food Chemistry*, 95(1):123-130;

Zang, W., Wang, T., Wang, Y., Li, M., Xuan, X., Ma, Y., ... Zhao, G. (2014). Myricetin exerts anti-proliferative, anti-invasive, and pro-apoptotic effects on esophageal carcinoma EC9706 and KYSE30 cells via RSK2. *Tumour Biology*, 35(12), 12583-12592.

Zang, Y., Zhang, L., Igarashi, K. e Yu, C. (2015). The anti-obesity and anti-diabetic effects of kaempferol glycosides from unripe soybean leaves in high-fat-diet mice. *Food & Function*, 6(3), 834-831.

Zavala, D., Mauricio, Q., Pelayo, A., Posso, M., Rojas, J. e Wolach, V. (2006). Citotoxic effect of *Physalis peruviana* (capuli) in colon cancer and chronic myeloid leukemia. *Anales de la Facultad de Medicina*, 67, 283-289.

Zawawy, N.A. (2015). Antioxidant, antitumor, antimicrobial studies and quantitative phytochemical estimation of ethanolic extracts of selected fruit peels. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 4(5), 298-309.

Zhang, M., Zhou, J., Wang, L., Li, B., Guo, J., Guan, X., ... Zhang, H. (2014). Caffeic acid reduces cutaneous tumor necrosis factor alpha (TNF- α), IL-6 and IL-1 β levels and ameliorates skin edema in acute and chronic model of cutaneous inflammation in mice. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 37(3), 347-354.

Zhao, J., Hong, T., Dong, M., Meng, Y. e Um, J. (2012). Protective effect of myricetin in dextran sulphate sodium-induced murine ulcerative colitis. *Molecular Medicine Reports*, 7(2), 565-570.

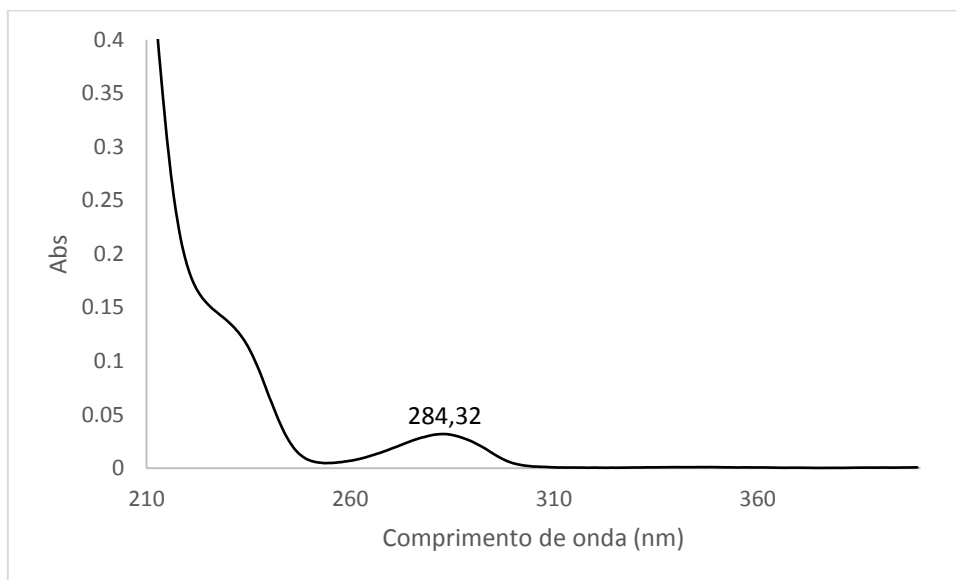
Zheng, Y., Luan, L., Chen, Y., Ren, Y e Wu, Y. (2012). Characterization of physalins and fingerprint analysis for the quality evaluation of *Physalis alkekengi* L. var. *franchetii* by ultra-performance liquid chromatography combined with diode array detection and electrospray ionization tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 71, 54– 62.

Zornoff, L. A. M., Matsubara, L. S., Matsubara, B. B., Okoshi, M. P., Okoshi, K., Pai-Silva, M. D., ... Paiva, S. A. R. (2006). Beta-carotene supplementation attenuates cardiac remodeling induced by one-month tobacco-smoke exposure in rats. *Toxicological Sciences*, 90(1), 259-266.

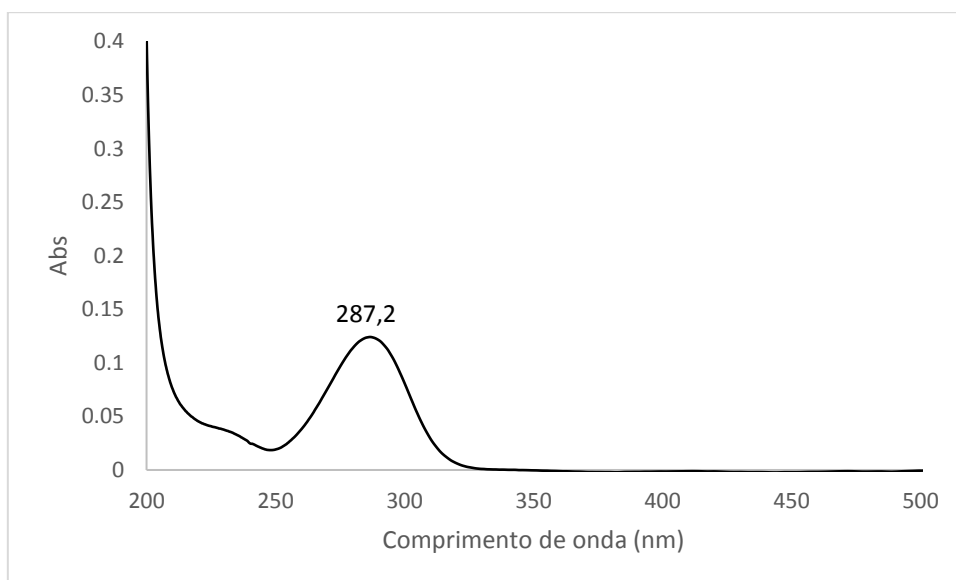
Zulueta, A., Esteve, M. e Frígola, A. (2009). ORAC and TEAC assays comparison to measure the antioxidant capacity of food products. *Food Chemistry*, 114(1), 310-316.

Anexos

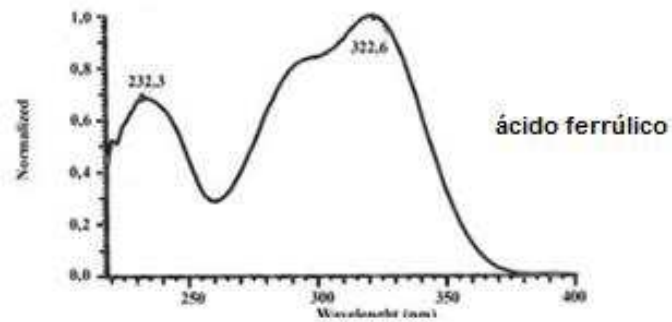
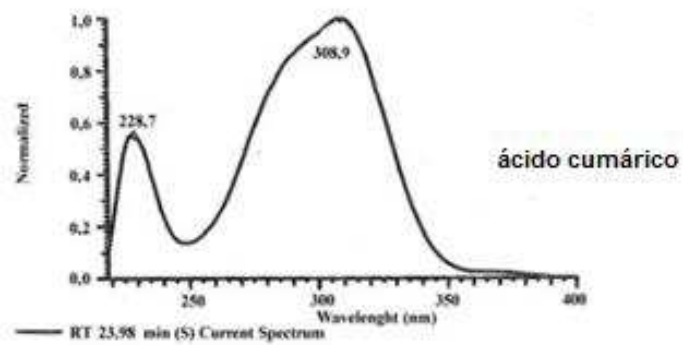
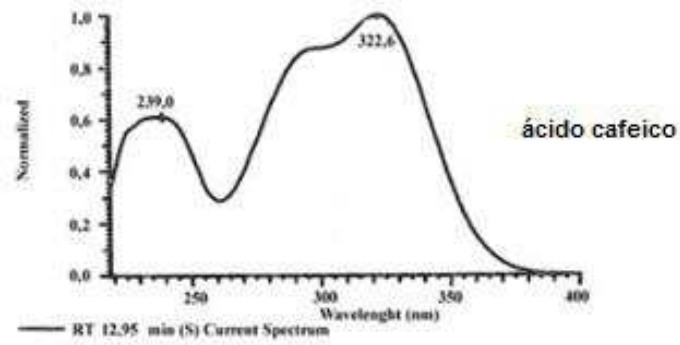
Anexo 1. Espectro do padrão de catequina



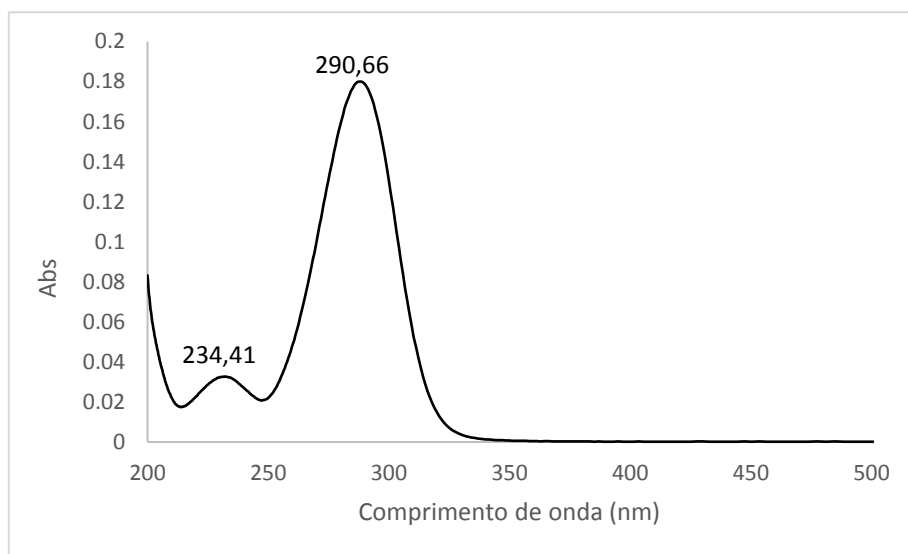
Anexo 2. Espectro do pico correspondente ao tempo de retenção do padrão de catequina (18,17 min)



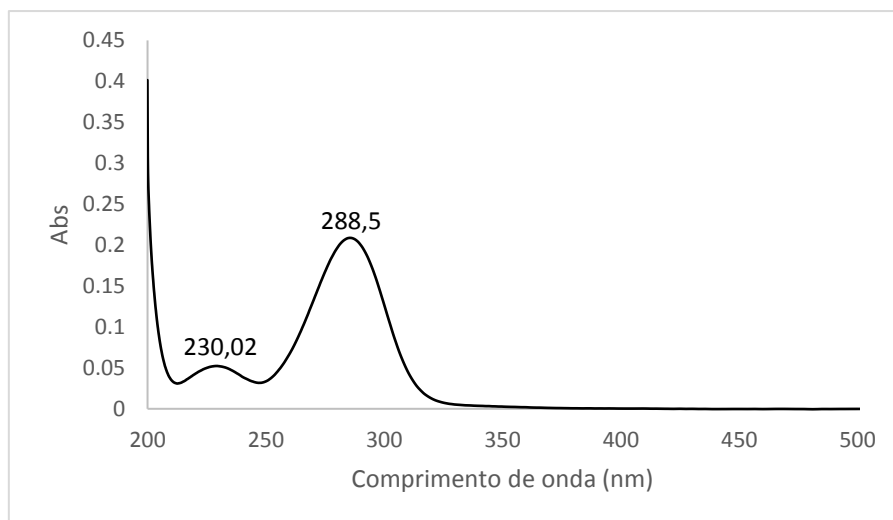
Anexo 3. Espectros de padrões de ácido cafeico, ácido cumárico e ácido ferrúlico (Kowalski & Wolski, 2003)



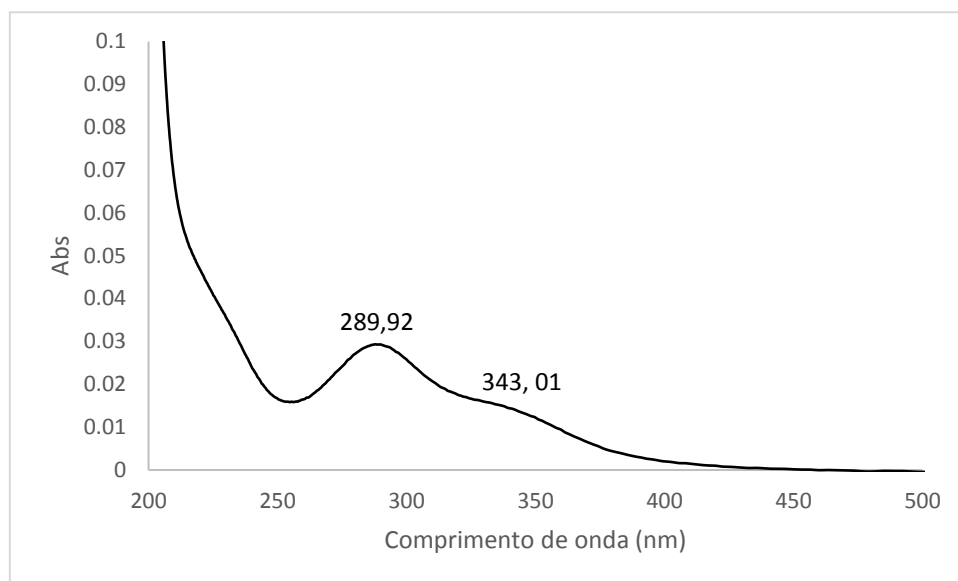
Anexo 4. Espectro do pico 1 (8,73 min) do cromatograma referente à identificação de ácidos fenólicos e da catequina na amostra sujeita a hidrólise ácida 8M



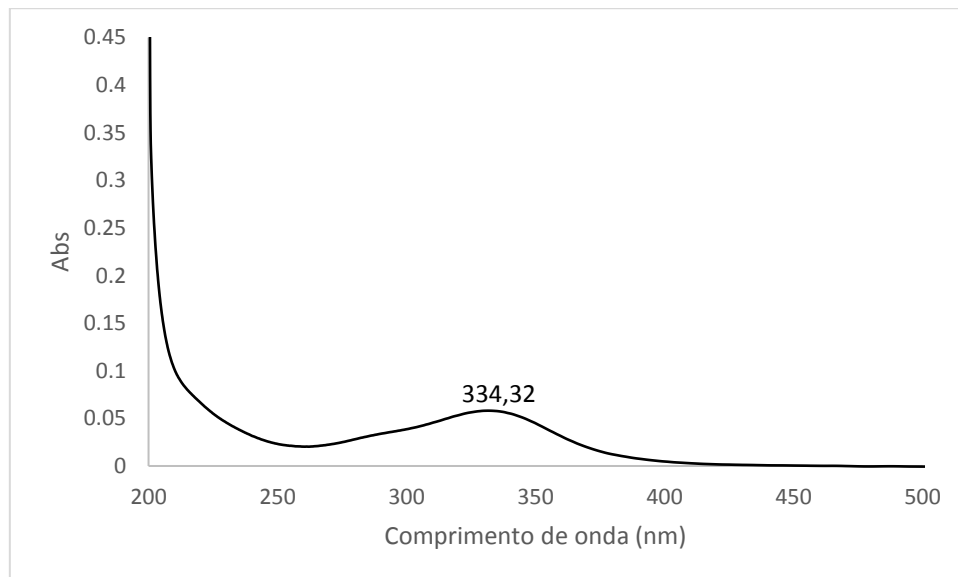
Anexo 5. Espectro do pico 3 (19,4 min) do cromatograma referente à identificação de ácidos fenólicos e da catequina na amostra sujeita a hidrólise ácida 8M



**Anexo 6. Espectro do pico correspondente à rutina na amostra sujeita a hidrólise ácida 8M
(24,96 min)**



**Anexo 7. Espectro de flavonoide desconhecido correspondente ao tempo de retenção 26,6 minutos na
amostra sujeita a hidrólise ácida 8M**



Anexo 8. Espectro de flavonoide desconhecido correspondente ao tempo de retenção 29,9 minutos na amostra sujeita a hidrólise ácida 8M

