

Influência de um suplemento nutricional com peptídeos de colágeno nas propriedades da derme

Influence of a nutritional supplement containing collagen peptides on the properties of the dermis

DOI: <http://dx.doi.org/10.5935/scd1984-8773.201572636>

Autores:

Flávia Alvim Sant'Anna Addor¹

¹ Mestrado – Diretora técnica laboratório de pesquisa clínica certificado Anvisa – São Paulo (SP), Brasil.

Correspondência para:

Flávia Alvim Sant'Anna Addor
Rua Attilio Delanina, 178 – Osasco
06023-070 – São Paulo - SP
E-mail: medci002@terra.com.br

Data de recebimento: 30/03/2015

Data de aprovação: 17/06/2015

Trabalho realizado em clínica privada – São Paulo (SP), Brasil.

Suporte Financeiro: Houve suporte financeiro da Fardoquímica S. A. R.

Conflito de Interesses: Nenhum.

RESUMO

Introdução: A perda de densidade e espessura dérmica, caracterizada por flacidez e afinamento cutâneo, pode estar relacionada com várias condições, como envelhecimento (intrínseco e extrínseco), além de mudanças abruptas de massa corporal, com ruptura das fibras colágenas, como gestação ou aumento de peso. Alguns nutrientes podem interferir positivamente no metabolismo dérmico, melhorando consequentemente suas propriedades funcionais.

Objetivo: avaliar o efeito de um suplemento nutricional na espessura e propriedades funcionais da derme, clínica e ultrassonograficamente.

Métodos: 28 pacientes do sexo feminino entre 35 e 65 anos com queixa de flacidez facial utilizaram o suplemento durante 90 dias; foram avaliadas com relação à segurança de uso, eficácia clínica, subjetiva e ultrassonográfica.

Resultados: O suplemento nutricional avaliado proporcionou aumento significativo da espessura da derme nas áreas avaliadas a partir de 30 dias de uso; observou-se melhora da firmeza, elasticidade, hidratação e do aspecto geral da pele de maneira significativa; não houve reação adversa relacionada ao produto durante o estudo.

Conclusões: O suplemento nutricional foi eficaz na melhora das condições da derme, aumentando a espessura e os parâmetros clínicos de firmeza, elasticidade e hidratação, além de se mostrar seguro e aceito na forma de utilização orientada.

Palavras-chave: colágeno; derme; envelhecimento da pele; nutrientes

ABSTRACT

Introduction: The loss of dermal density and thickness, characterized by sagging and thinning skin, may be related to various conditions such as aging (both intrinsic and extrinsic) as well as abrupt changes in body mass – such as pregnancy or increased weight – and the resulting rupture of collagen fibers. Some nutrients can positively affect the dermal metabolism, thus improving its functional properties.

Objective: To evaluate clinically and through ultrasound the effect of a nutritional supplement on the thickness of the dermis and on its functional properties.

Methods: Twenty-eight female patients between the ages of 35 and 65 years, with facial sagging complaints, used the supplement for 90 days, having been evaluated subjectively and through ultrasound for clinical safety and efficacy.

Results: The studied nutritional supplement provided a significant increase in dermal thickness after 30 days of use, in the areas evaluated. There was significant improvement in the firmness, elasticity, hydration and overall appearance of the skin. No adverse reaction related to the product was observed during the study period.

Conclusions: The nutritional supplement was effective in improving the conditions of the dermis, increasing its thickness and clinical parameters of firmness, elasticity, and hydration, and has been proven safe and well-tolerated when used as instructed.

Keywords: collagen; dermis; nutrients; skin aging

INTRODUÇÃO

O envelhecimento cutâneo é processo degenerativo progressivo, resultante de um declínio fisiológico das funções do tecido cutâneo, tanto no nível epidérmico como no dérmico.

Na derme, há diminuição na síntese de colágeno, assim como de outros elementos da matriz extracelular característicos do envelhecimento cronológico (intrínseco), que pode ser agravada pela metaloproteinase, cuja expressão aumentada ocorre durante o fotodano, levando à sua fragmentação.¹

A menopausa também é fator acelerador para as alterações degenerativas do colágeno dérmico e da espessura dérmica, com perda progressiva de colágeno, atingindo seu pico nos primeiros cinco anos (perda de até 30%) e depois ocorrendo perda de um a 2% ao ano; a terapia de reposição hormonal permite recuperação parcial, entretanto nem todas as pacientes podem utilizá-la.²

A suplementação oral com colágeno na tentativa de melhorar os sinais do envelhecimento não é prática recente; entretanto, a escassez de estudos e publicações sempre pôs em dúvida seu real valor.

Com o desenvolvimento de tecnologias que permitiram o isolamento de peptídeos para consumo oral, o tema retornou à discussão, com o aparecimento de uma nova geração de suplementação de colágeno: peptídeos específicos capazes de aumentar a expressão de determinadas moléculas ligadas à síntese colagênica e associações com outras substâncias, como vitaminas e fitoextratos, que atuariam de forma sinérgica, potencializariam esse efeito.

OBJETIVO

O objetivo deste estudo foi demonstrar os efeitos de um suplemento nutricional na melhora da estrutura dérmica, avaliando-se sua espessura e propriedades clínicas de firmeza, elasticidade e hidratação.

MATERIAL E MÉTODO

Trata-se de estudo unicêntrico, aberto, cego, não comparativo, realizado em centro de pesquisa privado, entre agosto e novembro de 2014.

Foram convidadas e posteriormente incluídas 30 pacientes do sexo feminino, com queixa de algum nível de flacidez facial, entre 35 e 65 anos, há quatro semanas antes do início do estudo sem nenhum tratamento cosméutico. Pacientes em uso de corticosteroides, imunossupressores, portadoras de endocrinopatias ativas ou qualquer condição clínica que pudesse interferir nas avaliações foram excluídas.

Após assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido e avaliação dermatológica para descartar dermatoses na área de avaliação, foi realizado exame ultrassonográfico (equipamento Voluson E (GE Healthcare) multicanal com *doppler* colorido e com transdutor de frequência de até 15MHz considerando dois locais para padronização: áreas malar e submentoniana. A avaliação ultrassonográfica foi realizada com o intuito de calcular a espessura da derme das áreas escolhidas e captar eventuais diferenças nos tempos de estudo.

Na sequência, as pacientes receberam o suplemento nutricional avaliado contendo peptídeos de colágeno, vitamina C e *Hibiscus sabdariffa*, em forma de sachê, com orientação para consumir dois sachês diluídos em 200ml de água fria ou quente uma vez ao dia, durante 12 semanas.

Foram orientadas finalmente a retornar mensalmente para avaliações clínicas de segurança, subjetivas e ultrassonográficas ou em caso de qualquer dúvida ou intercorrência. Em todas as visitas, foi aplicado um questionário para avaliar a firmeza, elasticidade, hidratação e o aspecto geral da pele; os itens desse questionário foram conceituados da seguinte forma, visando à boa acurácia das respostas:

- Piorou: houve piora visível em relação ao estado anterior para este item;
- Indiferente: não houve melhora nem piora em relação ao estado anterior para este item;
- Melhora parcial: houve algum grau de melhora percebida;
- Melhora total: a melhora percebida é intensa, observável facilmente, a melhor possível que a paciente poderia esperar com esse tipo de tratamento.

As características do produto também foram avaliadas, quanto à solubilidade e ao sabor, sendo graduados como muito ruim, ruim, bom ou muito bom.

Aspectos éticos:

O protocolo de estudo foi aprovado por Comitê de Ética Independente e conduzido de acordo com as normas de Boas Práticas Clínicas.

Avaliação estatística:

Para avaliar a normalidade da distribuição de dados, foi utilizado o Teste de Shapiro-Wilk; para a comparação do efeito nos tempos, foi realizado o teste de Wilcoxon através de suas medianas, com nível de significância de 95%.

RESULTADOS

Das 30 pacientes que iniciaram o estudo, 28 terminaram as avaliações; a média das idades foi de 48,5 anos. Dois eventos adversos foram relatados, um caso de cefaleia e um de enxaqueca. Ambos foram classificados como não relacionados ao produto e não graves. As duas pacientes que apresentaram evento adverso foram excluídas do estudo, pois descontinuaram o uso do produto.

Nenhuma paciente apresentou durante o tempo de estudo qualquer sintoma digestivo, como náusea, vômitos ou desconforto abdominal. Não houve mais nenhuma queixa constatada ou referida de efeito adverso durante o estudo.

As pacientes apresentaram boa adesão ao tratamento.

Avaliação subjetiva:

Todas as pacientes responderam a um questionário em cada visita, tendo em consideração o grau de melhora ou piora quanto ao parâmetro estudado.

O gráfico 1 apresenta os dados coletados para a avaliação de firmeza da pele. A firmeza foi conceituada aos pacientes como maior resistência à tração ou digitopressão.

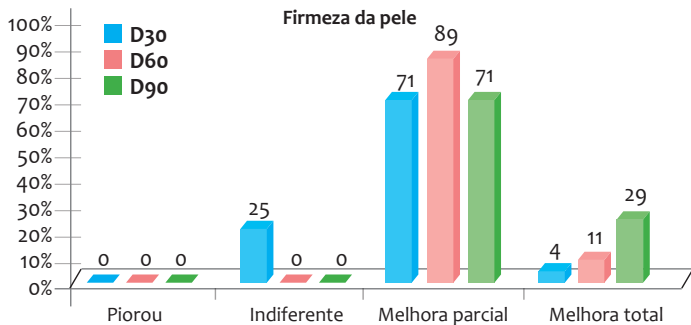


GRÁFICO 1: Porcentagem das respostas dos voluntários para o item firmeza da pele, respondidas após 30, 60 e 90 dias de estudo

O gráfico 1 permite observar que a partir de 30 dias de uso do suplemento houve melhora percebida de 75%; em 60 dias, a melhora percebida atingiu 100% da amostra. Ao término do estudo, 100% da amostra notou melhora parcial ou total da firmeza cutânea na face.

O gráfico 2 demonstra os resultados obtidos para o item elasticidade da pele. Esse termo foi conceituado como a capacidade de retornar a seu estado original após tração ou digitopressão.

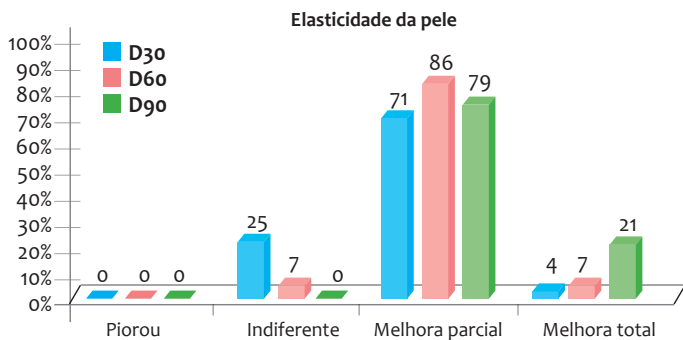


GRÁFICO 2: Porcentagem das respostas dos voluntários para o item elasticidade da pele, respondidas após 30, 60 e 90 dias de estudo

O gráfico 2 demonstra que a partir de 30 dias de uso do suplemento houve melhora percebida de 75%; em 60 dias, a melhora percebida atingiu 93% da amostra. Ao término do estudo, 100% da amostra notou melhora parcial ou total da elasticidade cutânea na face.

Outro parâmetro avaliado foi a hidratação da pele, conceituada como pele de aspecto íntegro, homogêneo, viçoso e macio ao toque. O gráfico 3 apresenta os resultados obtidos no tempo para esse item.

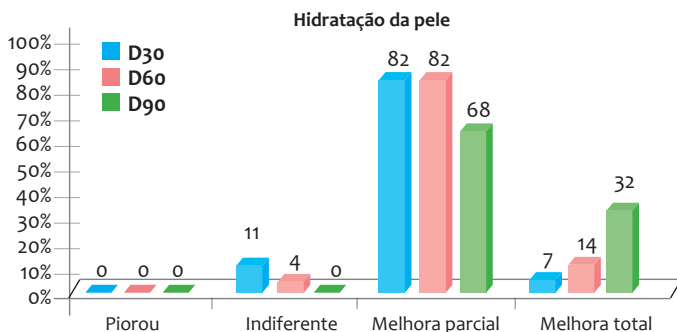


GRÁFICO 3: Porcentagem das respostas dos voluntários para o item hidratação da pele, respondidas após 30, 60 e 90 dias de estudo

O gráfico 3 demonstra que a partir de 30 dias de uso do suplemento houve melhora percebida de 89% na percepção de hidratação da pele; em 60 dias, a melhora percebida atingiu 96% da amostra. Ao término do estudo, 100% da amostra notou melhora parcial ou total da hidratação da pele facial.

Finalmente, houve o inquérito sobre o aspecto geral da pele, conceituado como aparência percebida diante da observação no espelho não levando em conta nenhum parâmetro específico, mas a impressão de vitalidade e suavização dos traços/sinais de envelhecimento.

O gráfico 4 demonstra os resultados obtidos para esse parâmetro:

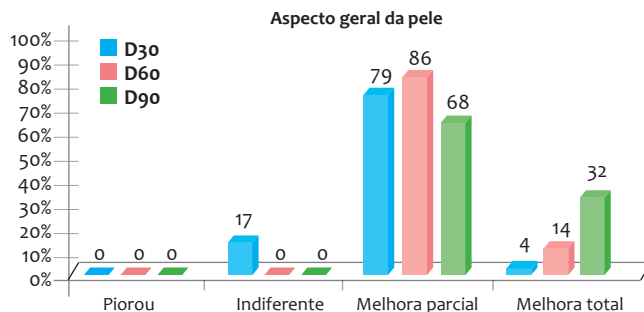


GRÁFICO 4: Porcentagem das respostas dos voluntários para o item aspecto geral da pele, respondidas após 30, 60 e 90 dias de estudo

O gráfico 4 mostra que a partir de 30 dias de uso do suplemento houve melhora percebida do aspecto geral da pele de 83%; a partir de 60 dias, a melhora percebida foi de 100%. Ao término do estudo, 100% da amostra notou melhora parcial (68%) ou total (32%) da hidratação da pele facial

Avaliação do suplemento: características de uso

A avaliação da solubilidade do produto, conceituada como o grau de dificuldade de dissolução em 200ml de água fria

ou quente, foi também avaliada. Após 90 dias de tratamento, 96% das pacientes relataram que a solubilidade foi fácil ou muito fácil

Quanto ao sabor, 100% das pacientes o consideraram bom ou muito bom.

Avaliação ultrassonográfica:

A partir dos dados de espessura dérmica captados em cada visita, foi calculada a mediana do grupo em cada tempo de avaliação: Dias zero, 30, 60 e 90. Observou-se aumento progressivo e significativo na mediana das espessuras, em ambas as áreas avaliadas, com aumento de 17% ao final do estudo em área malar e de 18,8% na área submentoniana, ambos significativos estatisticamente de acordo com o teste de Wilcoxon ($p < 0,001$ para ambos). O gráfico 5 detalha as medidas obtidas em cada tempo para as áreas avaliadas:

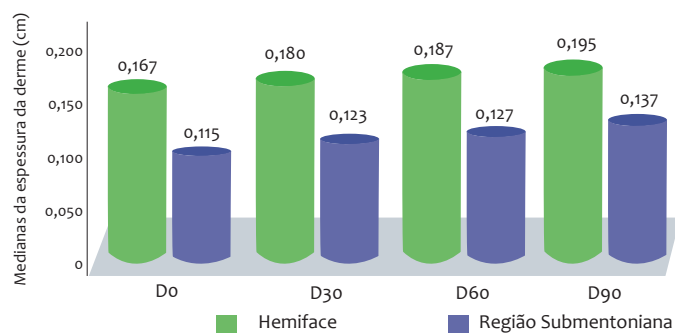


GRÁFICO 5: Mediana das medidas ultrassonográficas da espessura da derme na hemiface direita e região submentoniana, nos tempos de estudo 0, 30, 60 e 90 dias (Valores expressos em cm)

As comparações de D60 em relação a D30 e D90 em relação a D60 também apresentaram aumento estatisticamente significativo ($p \leq 0,001$) da espessura da derme malar e região submentoniana, caracterizando progressividade no efeito ao longo do tempo.

As figuras 1 e 2 exemplificam os achados ultrassonográficos para as áreas de estudo:

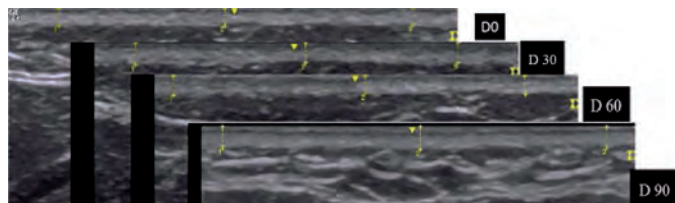


FIGURA 1: Imagens ultrassonográficas da região submentoniana captadas nos tempos de estudo D0 (visita inicial), D30 (visita de 30 dias), D60 (visita de 60 dias) e D90 (visita de 90 dias) A área dérmica está delimitada entre as marcações amarelas, na porção superior de cada imagem

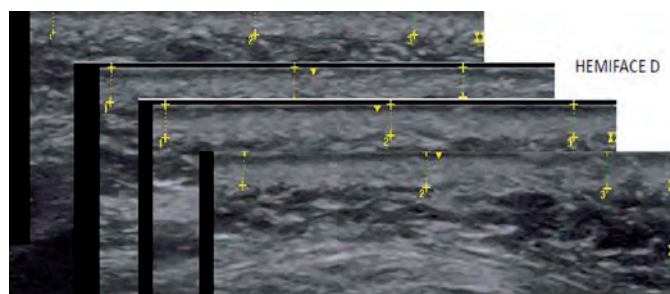


FIGURA 2: Imagens ultrassonográficas da região malar captadas nos tempos de estudo D0 (visita inicial), D30 (visita de 30 dias), D60 (visita de 60 dias) e D90 (visita de 90 dias) A área dérmica está delimitada entre as marcações amarelas, na porção superior de cada imagem

DISCUSSÃO

A utilização de colágeno como suplemento oral não é fato recente; tendo em vista que o colágeno é nutriente de valor estrutural, naturalmente casos de subnutrição, dietas rigorosas ou síndromes de má absorção evidentemente se beneficiariam da suplementação proteica.

A discussão atual, à medida que os estudos para postergar os sinais de envelhecimento avançam, é quanto à possibilidade de a suplementação com colágeno ter efeito benéfico e significativo na perda dérmica relacionada ao envelhecimento cutâneo.

Poucos estudos foram desenvolvidos para avaliar o impacto nos parâmetros de envelhecimento da suplementação de colágeno com gelatina e outros alimentos enriquecidos, como *shakes* e mesmo cápsulas.

A gelatina é polipeptídeo derivado do colágeno de alto peso molecular, entretanto é deficiente em aminoácidos essenciais. Seu valor nutricional é indiscutível, mas não possui atividades específicas.³

Finalmente, o estudo de Nishimoto e colaboradores, em ratos wistar, usando um modelo para demonstrar a síntese de colágeno histologicamente a partir do índice de hidroxiprolina demonstrou que peptídeos isolados teriam efeito significativo na síntese do colágeno, quando comparados ao da gelatina, cujos níveis não foram superiores ao do placebo.⁴

A partir de achados como esse, o colágeno hidrolisado (CH) voltou a merecer atenção.

O CH é digerido e absorvido no trato digestivo, sendo identificado no sangue pelos seus peptídeos constituintes, e alcançando a pele em até quatro dias.⁵

Devido a sua similaridade com o colágeno, especialmente o tipo I da derme, seu efeito não seria somente de reposição, mas também de promover a síntese do colágeno do tipo I, desempenhando papel positivo no envelhecimento e mesmo em outras desordens com envolvimento dérmico, como reparação tecidual.^{6,7}

O colágeno hidrolisado é caracterizado por peso molecular relativamente baixo (<6 kDa), o que facilita sua absorção e biodisponibilidade. Entretanto, há inúmeros tipos de colágeno

hidrolisado, de acordo com a fonte proteica, a forma de processamento e de oferta.^{8,9}

Cada colágeno hidrolisado pode ter um conjunto de efeitos, e durante os estudos, seus efeitos foram avaliados *in vitro*, muitas vezes em modelos não comparáveis. Por esses motivos, há muita dificuldade em reunir dados comparáveis sobre o assunto, já que a expressão “colágeno hidrolisado” designa um grupo grande de associações de peptídeos.

Portanto, os resultados obtidos para um determinado CH não pode ser extrapolado para outros.

O colágeno hidrolisado que foi estudado no presente artigo é polipeptídeo obtido a partir de processo enzimático biotecnológico de pele animal, destituído de impurezas e outras moléculas como lípidos e carboidratos, e, portanto, de fácil digestibilidade, sofrendo facilmente a ação das enzimas proteolíticas, com absorção de mais de 90%.¹⁰

Esse peptídeo de colágeno avaliado neste estudo é constituído de 18 peptídeos de colágeno tipo I, sendo oito deles essenciais. Caracteriza-se pela maior concentração de glicina, prolina e hidroxiprolina, aminoácidos que representam cerca de 50% do teor total de aminoácidos da composição. Essa composição demonstrou promover a colagenese a partir dos fibroblastos, além de o colágeno sintetizado ser mais firme.³

Os peptídeos específicos gerados a partir da digestão do peptídeo de colágeno, Gly-Glu e Pro-Hypro são quimioatraídos pelos fibroblastos dérmicos como sinalização de “destruição” de colágeno, ativando assim os fibroblastos.¹¹

Há também a ativação da enzima Hyaluronan sintetase 2, com aumento da síntese do ácido hialurônico e de glicosaminoglicanos.^{12,13}

O peptídeo de colágeno também demonstrou estimular a produção de Decorin, proteoglicano componente do tecido conectivo, que se liga ao colágeno tipo 1, tem papel na organização da matriz extracelular e, regulando a agregação dos feixes, leva à produção de fibras de colágeno.¹⁴

Outra tendência que faz haver maior diversidade de suplementos nessa área é a associação de outras moléculas, com efeito protetor ou benéfico à síntese do colágeno, favorecendo assim os efeitos dos peptídeos. A ação da vitamina C em estimular a proliferação de fibroblastos já é amplamente conhecida.¹⁵

Os trabalhos de Pinnel na década de 1980 demonstraram que o ácido L ascórbico é capaz de induzir a síntese de procolágeno em cultura de fibroblastos dérmicos;¹⁶ esses trabalhos demonstraram que esse aumento de síntese ocorria mesmo em fibroblastos mais velhos, o que se torna especialmente relevante tendo em vista que, com a idade, há diminuição fisiológica das reservas de vitamina C na derme.¹⁷

A associação de substâncias como fitoextratos pode também potencializar os efeitos das associações de peptídeos do colágeno hidrolisado, permitindo melhor aproveitamento pela neutralização de radicais livres, por exemplo.

A planta *Hibiscus sabdariffa*, tradicionalmente usada para fins alimentícios em função de seu sabor, demonstrou em modelos *in vitro* propriedades antioxidantes, lipolíticas, hipoglicemiantes, diuréticas, entre outras. Seu uso para redução da resistência à insulina foi demonstrado, a partir de seus polifenóis, pois possui altas concentrações do ácido fenólico e proantocianidinas.^{18,19}

Seu amplo mecanismo antioxidante, entretanto, se deve à combinação de mais compostos do que esse extrato apresenta. O mecanismo de ação antioxidante potente do *Hibiscus sabdariffa* já era estudado em neoplasias, ficando evidenciado recentemente a partir do isolamento de seus principais compostos antioxidantes: ácidos clorogênico e neoclorogênico, criptoclorogênico, rutina e isoquercitina.^{20,21}

O presente estudo visou avaliar os efeitos de um suplemento nutricional em derme humana que reuniu estas três moléculas de ação sinérgica: peptídeo de colágeno, Vitamina C e *Hibiscus sabdariffa*. Trata-se de estudo não invasivo, que permitiu através da avaliação ultrassonográfica a comprovação dos sinais percebidos pelas pacientes. Ao lado da melhora progressiva e significativa da firmeza, elasticidade e hidratação cutâneas, houve aumento real e mensurável da espessura dérmica, em duas áreas faciais: malar, em que houve aumento de 17% da espessura, e submentoniana, com aumento da espessura de 18,8%. Este último dado é de especial interesse, visto que essa área é mais complexa para tratar a flacidez.

A avaliação dessas pacientes possibilitou observar a segurança de uso do produto, não ocasionando nenhuma reação sistêmica ao longo de três meses de consumo.

A utilização do suplemento diariamente mostrou-se agradável, fator fundamental para a adesão a tratamento prolongado. Com relação ao sabor, destaca-se dado importante: mesmo o uso continuado, durante três meses, não provocou redução de tolerância (as pacientes não “enjoaram” de ingerir o suplemento) o que é fator preponderante na adesão ao tratamento.

CONCLUSÃO

O uso diário de um suplemento nutricional contendo peptídeos de colágeno, Vitamina C e *Hibiscus sabdariffa* promoveu aumento significativo da espessura dérmica nas áreas estudadas da face (malar e submentoniana) com repercussões positivas na avaliação de firmeza, elasticidade e hidratação cutâneas. A segurança de uso aliada a efeitos comprovados permitem concluir que essa associação é benéfica na abordagem do envelhecimento facial, quanto à flacidez e atrofia dérmica. ●

REFERÊNCIAS

1. Fisher GJ, Kang S, Varani J, Bata-Csorgo Z, Wan Y, Datta S, et al. Mechanisms of photoaging and chronological skin aging. *Arch Dermatol*. 2002;138(11):1462-70.
2. Brincaat M, Mouniz CF, Studd JW, Cooper d. Sex hormones and skin collagen content in post menopausal women. *Br Med J (Clin Res Ed)*. 1983;287(6402):1337-8.
3. Zague V. A new view concerning the effects of collagen hydrolysate intake on skin properties. *Arch Dermatol Res*. 2008;300(9):479-83.
4. Hiura, N, Sato R, Suzuki K, Asano R. Effect of oral administration of gelatin and collagen peptides on the hydroxyproline content of rats skin. *Journal of the Japanese Society for Food Science and Technology*. 2002;49;3 [acesso em 30 de janeiro de 2015]. Disponível em: <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=JP2002003318>
5. Ohara H, Matsumoto H, Ito K, Iwai K, Sato K. Comparison of quantity and structures of hydroxyproline-containing peptides in human blood after oral ingestion of gelatin hydrolysates from different sources. *J Agric Food Chem*. 2007;55:1532-35.
6. Zague V. Collagen hydrolysate intake increases skin collagen expression and suppresses matrix metalloproteinase 2 activity. *J Med Food*. 2011;14(6):618-24.
7. Atamas SP, Luzina IG, Ingels J, Choi J, Wong WK, Furst DE, et al. Stimulation with type I collagen induces changes in gene expression in peripheral blood mononuclear cells from patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis (scleroderma). *Clin Exp Immunol*. 2010;161(3):426-35.
8. Zhuang, Yongliang, Zhao X, Zhang Z, Li B. Effects of collagen and collagen hydrolysate from jellyfish (*Rhopilema esculentum*) on mice skin photoaging induced by UV irradiation. *J Food Sci*. 2009;74(6):H183-8.
9. Postlethwaite AE, Wong WK, Clements P, Chatterjee S, Fessler BJ, Kang AH, et al. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial of oral type I collagen treatment in patients with diffuse cutaneous systemic sclerosis: I. oral type I collagen does not improve skin in all patients, but may improve skin in late-phase disease. *Arthritis Rheum*. 2008;58(6):1810-22.
10. Oesser S, Adam M, Babel W, Seifert J. Oral administration of (14)C labeled gelatin hydrolysate leads to an accumulation of radioactivity in cartilage of mice (C57/BL). *J Nutr*. 1999;129(10):1891-5.
11. Postlethwaite AE, Seyer JM, Kang AH. Chemotactic attraction of human fibroblasts to type I, II, and III collagens and collagen-derived peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1978;75(2):871-5.
12. Matsuda N, Koyama Y, Hosaka Y, Ueda H, Watanabe T, Araya T, et al. Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in the dermis. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2006;52(3):211-5.
13. Minaguchi J, Koyama Y, Meguri N, Hosaka Y, Ueda H, Kusubata M, et al. Effects of ingestion of collagen peptide on collagen fibrils and glycosaminoglycans in Achilles tendon. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 2005;51(3):169-74.
14. Pulkkinen L, Alitalo T, Krusius T, Peltonen L. Expression of decorin in human tissues and cell lines and defined chromosomal assignment of the gene locus (DCN). *Cytogenet Cell Genet*. 1992;60(2):107-11.
15. Hata R, Senoo H. L-ascorbic acid 2-phosphate stimulates collagen accumulation, cell proliferation, and formation of a three-dimensional tissuelike substance by skin fibroblasts. *J Cell Physiol*. 1989;138(1):8-16.
16. Pinnel SR, Murad S, Darr D. Induction of collagen synthesis by ascorbic acid. A possible mechanism. *Arch Dermatol*. 1987;123(12):1684-6.
17. Patnaik BK, Kanungo MS. Ascorbic acid and aging in the rat. Uptake of ascorbic acid by teeth and concentration of various forms of ascorbic acid in different organs. *Biochem J*. 1966;100(1):59-62.
18. Da-Costa-Rocha I, Bonnlaender B, Sievers H, Pischel I, Heinrich M. *Hibiscus sabdariffa* L. - a phytochemical and pharmacological review. *Food Chem*. 2014;165:424-43.
19. Peng CH, Yang YS, Chan KC, Wang CJ, Chen ML, Huang CN. *Hibiscus sabdariffa* polyphenols alleviate insulin resistance and renal epithelial to mesenchymal transition: a novel action mechanism mediated by type 4 dipeptidyl peptidase. *J Agric Food Chem*. 2014;62(40):9736-43.
20. Worawattananutai P, Itharat A, Ruangnoo S. In vitro antioxidant, anti-inflammatory, cytotoxic activities against prostate cancer of extracts from *Hibiscus sabdariffa* leaves. *J Med Assoc Thai*. 2014;97 Suppl 8:S81-7.
21. Wang J, Cao X, Jiang H, Qi Y, Chin KL, Yue Y. Antioxidant activity of leaf extracts from different *Hibiscus sabdariffa* accessions and simultaneous determination five major antioxidant compounds by LC-Q-TOF-MS. *Molecules*. 2014;17;19(12):21226-38.