



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DO
MARANHÃO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DA FRAÇÃO
HIDROETANÓLICO EM ACETATO DE ETILA E DICLOROMETANO DE
VINAGREIRA (*Hibiscus sabdariffa* L.), FRENTE A CEPAS BACTERIANAS
PATOGENICAS**

SÃO LUÍS
2022

FABIANA DE CÁSSIA SANTOS SOEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DA FRAÇÃO
HIDROETANÓLICA EM ACETATO DE ETILA E DICLOROMETANO DE
VINAGREIRA (*Hibiscus sabdariffa* L.), FRENTE A CEPAS PATOGÊNICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciência Animal

Área de Concentração: Medicina
Veterinária Preventiva

Orientadora: Prof. Dra. Francisca Neide
Costa

SÃO LUÍS
2022

FABIANA DE CÁSSIA SANTOS SOEIRO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DA FRAÇÃO
HIDROETANÓLICA EM ACETATO DE ETILA E DICLOROMETANO DE
VINAGREIRA (*Hibiscus sabdariffa* L.), FRENTE A CEPAS BACETERIANAS
PATOGENICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Universidade Estadual do Maranhão - UEMA, como requisito para a obtenção do título de mestre em Ciência Animal

Área de Concentração: Medicina
Veterinária Preventiva

Dissertação defendida e aprovada em: 04 de Fevereiro de 2022 pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

BANCA EXAMINADORA



Professor Dr Victor Elias Mouchrek Filho
1º membro



Professora Dra. Isabel Azevedo Carvalho
2º membro

Professora Dra. Francisca Neide Costa – UEMA
Orientadora

Soeiro, Fabiana de Cássia Santos.

Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da fração hidroetanólico em acetato de etila e diclorometano de vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.), frente a cepas bacterianas patogênicas / Fabiana de Cássia Santos Soeiro. – São Luís, 2022.

... f

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Estadual do Maranhão, 2022.

Orientadora: Profa. Dra. Francisca Neide Costa.

1.Hibisco. 2.Antiocianinas. 3.Micro-organismos. I. Título.

Elaborado por Giselle Frazão Tavares - CRB 13/665

Dedico este trabalho, com muito carinho *in*
memorian à minha mãe Maria das Dores.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por ter permitido e me capacitado para que eu realizasse esse sonho, por todas as vezes em que pensei em desistir e ele me sustentou com sua graça.

A minha orientadora Francisca Neide Costa, por toda ajuda e atenção que foi primordial para que eu conseguisse realizar esse trabalho.

A minha amiga Luciana da Silva Bastos, que muito me auxiliou e incentivou, desde o início do projeto e na execução do trabalho.

A CAPES pela bolsa de mestrado que me foi concedida durante o mestrado.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciência Animal.

Ao Antonio Carlos Freitas Souza, por ter me ajudado na elaboração e execução do projeto.

Ao Núcleo de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá – IEPA, pelo apoio dado durante a pesquisa, por ter processado as amostras que foram utilizadas no desenvolvimento do trabalho.

Ao meu marido Dionizio, que sempre me incentivou e me apoiou durante todo o mestrado.

Aos meus Familiares em especial aos meus tios Maria, José e Maria de Jesus pelo apoio e incentivo.

A minha mãe Maria das Dores (in memorian) que sempre cuidou de mim até o seu último instante de vida, me incentivou a estudar e me apoiou incondicionalmente sempre que eu tinha um sonho a ser realizado.

SOEIRO, F.C.S.; COSTA, F. N. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DA FRAÇÃO HIDROETANÓLICA EM ACETATO DE ETILA E DICLOROMETANO DE VINAGREIRA (*Hibiscus sabdariffa* L.), FRENTE A CEPAS BACTERIANAS PATOGÊNICAS. [EVALUATION OF *IN VITRO* ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE HYDROALCOHOLIC FRACTION IN VINEGAR ETHYL ACETATE AND DICHLOROMETHANE (*Hibiscus sabdariffa* L.), AGAINST PATHOGENIC BACTERIAL STRAINS. in the city of São Luís - MA. 2021 45f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Estadual do Maranhão, São Luís, 2021.

Resumo

O *Hibiscus sabdariffa* L. é uma espécie vegetal que pertence à família Malvaceae, conhecido popularmente como vinagreira no estado do Maranhão, é uma planta rica em proteínas, gorduras, carboidratos, ácidos, sais minerais, vitaminas e diversos tipos de compostos fenólicos, tem ampla utilização nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Este estudo objetivou avaliar a atividade da fração hidroetanólica em acetato de etila e diclorometano de vinagreira (*H. sabdariffa* L.), frente a cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, bem como analisar a composição e detectar a presença de compostos fenólicos nas partes aéreas da vinagreira. Para isso, as partes aéreas do *H. sabdariffa* foram encaminhadas para o Herbário Rosa Maria Mochel localizado na UEMA onde foram identificadas e o material vegetal coletado, enviado para o Núcleo de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá – IEPA. A fração hidroetanólica em acetato de etila e diclorometano da vinagreira foram avaliados quanto ao teor de compostos fenólicos totais e à atividade antioxidante por Cromatografia em coluna em sílica gel. A análise em cromatografia de camada delgada foi realizada com as frações da extração líquido-líquido e com as frações da cromatografia em coluna, sendo comparado com o padrão quercetina. O hibisco apresentou atividade antibacteriana distinta, provavelmente relacionada com o solo, clima e disponibilidade de fitonutrientes influenciando nas concentrações e mesmo na qualidade de polifenóis totais e antocianinas nas diferentes estruturas, o que justifica os valores encontrados no presente estudo.

Palavras-chave: Hibisco, Antiocianinas, Micro-organismos.

SOEIRO, F.C.S.; COSTA, F. N EVALUATION OF IN VITRO ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF THE HYDROALCOHOLIC FRACTION IN VINEGAR ETHYL ACETATE AND DICHLOROMETHANE (*Hibiscus sabdariffa* L.), AGAINST PATHOGENIC BACTERIAL STRAINS. [AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DA FRAÇÃO HIDROETANÓLICA EM ACETATO DE ETILA E DICLOROMETANO DE VINAGREIRA (*Hibiscus sabdariffa* L.), FRENTE A CEPAS BACTERIANAS PATOGÊNICAS.]. 2021. 45f Dissertation (Master of Animal Science) - University of Maranhão, São Luís, São Luís, 2021.

Abstract

Hibiscus sabdariffa L. is a plant species that belongs to the Malvaceae family, popularly known as vinegar in the state of Maranhão, it is a plant rich in proteins, fats, carbohydrates, acids, minerals, vitamins and several types of phenolic compounds, it has a wide use in the food and pharmaceutical industries. This study aimed to evaluate the activity of the hydroalcoholic fraction in ethyl acetate and dichloromethane of vinegar (*H. sabdariffa* L.), against strains of *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus*, as well as to analyze the composition and detect the presence of phenolic compounds in the aerial parts of the vinegar plant. For this, the aerial parts of *H. sabdariffa* were sent to the Rosa Maria Mochel Herbarium located at UEMA where they were identified and the plant material collected was sent to the Food Science and Technology Center of the Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá – IEPA. The hydroalcoholic fraction in ethyl acetate and dichloromethane of the vinegar were evaluated for the content of total phenolic compounds and the antioxidant activity by column chromatography on silica gel. The thin layer chromatography analysis was performed with the liquid-liquid extraction fractions and with the column chromatography fractions, being compared with the quercetin standard. *Hibiscus* showed distinct antibacterial activity, probably related to soil, climate and phytonutrient availability, influencing the concentrations and even the quality of total polyphenols and anthocyanins in the different structures, which justifies the values found in the present study. The results suggest the continuity of studies involving the different structures of *hibiscus* and the factors responsible for its antimicrobial activity (total polyphenols and anthocyanins).

Key words: *Hibiscus*. Anthocyanins. Microorganisms

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Vinagreira.....	16
Figura 2. Estrutura dos Flavonoides.....	18
Figura 3. Estrutura dos principais compostos antociânicos.....	19
Figura 4. <i>Hibiscus sabdariffa</i> Linnaeus.....	21
Figura 5. Exsicata <i>Hibiscus sabdariffa</i> Linnaeus.....	22
Figura 6. Análises de Cinzas.....	23
Figura 7. Determinação de proteína pelo método de kjeldahl.....	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Esqueleto principal.....	18
Tabela 2. Valores da composição centesimal das folhas de vinagreira.....	30
Tabela 3. Halo de inibição em mm da fração de acetato de etila frente aos micro-organismo testes.....	32
Tabela 4. Reações indicativas de substâncias presentes na fração de acetato de etila diclormetano.....	34
Tabela 5 - 3. Avaliação fitoquímica dos extratos de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	35

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

m	Metro
°C	Graus Celsius
cm	Centímetros
NaOH	Hidróxido de sódio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
g	Grama
ml	Mililitro
HCl	Ácido clorídrico
AA	Ácido ascórbico
Vg	Volume gasto
N	Normalidade
mg/L	Miligramas por Litro
ml	Mililitro
µg/L	Micrograma por litro
h	Horas
Min	Minuto
pH	Potencial Hidrogeniônico
IEPA	Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá
NUCTAL	Núcleo de Ciência e Tecnologia de Alimentos
spp.	Subespécie
UEMA	Universidade Estadual do Maranhão
CCD	cromatografia em camada delgada
%	Porcentagem
A.O.A.C.	Association of Official Analytical Chemists
µg	Micrograma
UV	Ultravioleta
µg/mL	Micrograma por mililitro
BaSO₄	Sulfato de Bário
MH	Mueller-Hinton
UMD	Umidade
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
PT	Proteína
CZ	Cinzas
VitC	Vitamina C
KOH	Hidróxido de Potássio
n.r.	Não Realizado
Mm	Milímetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Geral	15
2.2	Específicos.....	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	16
3.1	Hibisco (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) Características	16
3.2	Hibiscos - Compostos fenólicos	18
4	MATERIAL E METODOS	22
4.1	Coleta e Classificação do Material.....	22
4.2	Caracterização Físico-Química das partes Aéreas do <i>Hibiscus</i>	23
4.2.1	Cinzas	23
4.2.2	Umidade	24
4.2.3	Proteínas	25
4.2.4	Ácido Ascórbico	26
4.2.5	Lipídios.....	26
4.3	Preparo dos Extratos e Extração dos Óleos.....	27
4.4	Screening fitoquímico com a utilização da Cromatografia em Coluna (CC).....	28
4.5	Preparação do Inóculo para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos.....	28
4.5.1	Avaliação da atividade antimicrobiana da fração hidroalcoólico em acetato de etila e diclorometano de vinagreira (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) pelo teste de disco-difusão em ágar.....	29
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5.1	Análise da composição centesimal.....	30
5.2	- Atividade antimicrobiana da fração hidroalcoólico em acetato de etila e diclorometano de vinagreira (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) frente cepas de <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Staphylococcus aureus</i>	32
5.3	Análise fitoquímica da fração hidroalcoólico em acetato de etila e diclorometano de vinagreira (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.).....	34
6	CONCLUSÕES:	37
	REFERÊNCIAS	38

1 INTRODUÇÃO

Conhecido popularmente como hibisco, hibiscus, rosela, groselha, azedinha, a espécie *Hibiscus sabdariffa* L. pertence à classe das Dicotiledôneas, família das Malváceas e gênero *Hibiscus* (EMBRAPA, 2010). Originária da Índia, do Sudão e da Malásia, sendo posteriormente levado para a África, Sudeste da Ásia e América central. No Brasil, foi trazida pelos africanos, através do tráfico de escravos (MACIEL *et al.*, 2012).

Hibiscus sabdariffa L. contém proteínas, gorduras, carboidratos, ácidos, sais minerais, vitaminas e diversos tipos de compostos fenólicos (BORRÁS-LINARES *et al.*, 2015). No entanto, o perfil químico da planta é afetado pela variabilidade genética, tipo de solo e solvente de extração (WANG *et al.*, 2015; OBOUAYEBA *et al.*, 2014). Neste sentido, é difícil comparar os dados disponíveis na literatura devido às diferentes condições de cultivo, armazenamento e extração (SINDI; MARSHALL; MORGAN, 2014; RAMIREZ-RODRIGUES *et al.*, 2011).

A eficácia da ação antioxidante do hibisco é amplamente influenciada por fatores genéticos, adubação, condições ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta, entre outros. Alguns autores, como Chao e Yin (2009), relatam uma possível relação entre a quantidade de antocianinas e a atividade antimicrobiana do hibisco.

No hibisco, os principais compostos fenólicos presentes são os ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido cafeico e *p*-cumárico, que se encontram esterificados ao ácido quínico, formando os ácidos clorogênicos, (OLIVEIRA; BASTOS, 2011; RIAZ; CHOPRA, 2018).

As antocianinas fazem parte da classe dos flavonoides, que são substâncias naturais formados por estruturas polifenólicas e que comumente estão presentes em frutos, flores, folhas e raízes das plantas. Em relação à atividade antibacteriana, grupos fenólicos hidroxilo dos flavonoides exibem afinidade com as proteínas e, devido a isso, atuam como inibidores de enzimas bacterianas, podendo também intervir nas suas vias de síntese (FLAMBÓ, 2013).

Antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, mesmo em baixas concentrações, por diversos mecanismos podem postergar ou prevenir a oxidação de um determinado substrato, neutralizando as espécies reativas (ou radicais livres) formadas pelo metabolismo e restaurando o equilíbrio dinâmico do corpo (FERREIRA *et al.*, 2010; SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2010; SILVA *et al.*, 2010).

O consumo de antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos, presentes na maioria das plantas, inibe a formação de radicais livres, e tem sido associado a uma menor

incidência de doenças relacionadas com o estresse oxidativo, este podendo intensificar o risco para o desenvolvimento de várias doenças (FIRMINO, 2011; OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A maioria dos estudos de *Hibiscus sabdariffa* é realizada com os cálices e, apesar do volume crescente de investigação, são poucos os estudos fitoquímicos das folhas (ZHEN *et al.*, 2016), sendo uma parte bastante apreciada pela culinária maranhense.

As partes mais utilizadas da vinagreira são as folhas e os cálices. Por se tratar de uma hortaliça não convencional, as folhas são bastante utilizadas em preparações de alimentos regionais como por exemplo o arroz de cuxá, comida típica do estado do Maranhão, além de saladas in natura e outros alimentos em que são utilizadas no processo de cocção (CÂNDIDO; STURZA; BARBOSA, 2017)

Este estudo objetivou avaliar a atividade da fração hidroetanólica em acetato de etila e diclorometano de vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.), frente as cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, bem como analisar a composição centesimal e comprovar a presença de compostos fenólicos nas partes aéreas da vinagreira.

Espera-se com este trabalho, analisar a composição centesimal das folhas de vinagreira, detectar a presença de compostos fenólicos nas partes aéreas da vinagreira e o preparo do extrato hidroetanólico verificando sua ação antimicrobiana frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar *in vitro* a atividade antimicrobiana da fração hidroetanólica em acetato de etila e diclorometano de vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.) frente a cepas bacterianas patogênicas.

2.2 Específicos

- Avaliar os parâmetros físico-químico das partes aéreas vinagreira;
- Elaborar o extrato hidroetanólico da vinagreira em 20 °C e 60 °C durante 90 e 120 min, respectivamente;
- Avaliar o rendimento dos extratos elaborados;
- Avaliar a concentração de flavonoides e antocianinas nos extratos produzidos;
- Avaliar o teor de vitamina C nos extratos produzidos.
- Avaliar o potencial antimicrobiano por micro diluição em poços e disco-difusão dos extratos produzidos frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, E *Staphylococcus aureus*.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) Características

O gênero *Hibiscus* pertence à família Malvaceae e compreendem mais de 300 espécies de ervas anuais ou perenes, arbustos ou árvores. A espécie *Hibiscus sabdariffa* L. (Figura 01) é uma herbácea anual, que pode atingir 2,4 m de altura, é de fácil cultivo e é encontrada em regiões tropicais e subtropicais, especialmente na Índia, Arábia Saudita, China, Malásia, Indonésia, Filipinas, Vietnã, Sudão, Egito, Nigéria e México. É utilizada nas indústrias alimentícia e farmacêutica e sua fibra pode ser utilizada em confecções de vestuários, redes de pesca e cordas (BORRÁS-LINARES *et al.*, 2015).



Figura 1 – Planta de *Hibiscus sabdariffa* L.)

Fonte: Elaborado pelo próprio Autor, 2021.

O Hibiscus sabdariffa L é conhecido popularmente como rosélia, bissap, oseille de guinée, karkadeh, azedinha, caruru-azedo, pampolha, papoula-de-duas-cores, quiabo-azedo, quiabo-roxo e vinagreira (RAMOS *et al.*, 2011), já seu chá é conhecido como chá de hibisco, zobo, roselle, azeda vermelha, chá de leite, água de Jamaica e karkade (ZHEN *et al.*, 2016; SINDI; MARSHALL; MORGAN, 2014).

Caracteriza-se por ser um arbusto ereto e ramificado que atinge alturas superiores a 1,80 metros, com ciclo anual. A corola é formada por cinco sépalas de coloração vermelha dispostas em cone, formando o cálice. Na base do cálice está o calículo, de formato pontiagudo e disposto em círculo, onde estão localizados a cápsula deiscente aveludada e o fruto, medindo aproximadamente dois centímetros de comprimento que abriga as sementes. Sua flor é simples, séssil e axilar. As folhas são verdes, alternas, longo-pecioladas, palmatilobadas com três a cinco lobos estreitos e agudos e nervuras arroxeadas. Desenvolve-se melhor em regiões cujo clima é quente, visto sua grande sensibilidade a baixas temperaturas. Necessita de 800 a 1600 mm de chuvas e temperaturas entre 18 e 35 °C para se desenvolver (MARGANHA *et al.*, 2010; MACIEL *et al.*, 2012; ROSA, 2013).

A *Hibiscus sabdariffa* L. contém gorduras, carboidratos, proteínas, vitaminas, ácidos graxos, sais minerais e diversos tipos de compostos fenólicos (BORRÁS-LINARES *et al.*, 2015). Entretanto, o perfil químico da planta é afetado por alguns fatores, como, o tipo de solo a variabilidade genética e solvente utilizado na extração (WANG *et al.*, 2015; OBOUAYEBA *et al.*, 2014).

As folhas são verdes com veias avermelhadas e pecíolos longos ou curtos de margens dentadas e podem atingir de 7,5 a 12,5 cm de comprimento (MOHAMED *et al.*, 2007). As folhas podem ser consumidas cruas ou cozidas e em vários países são utilizadas como tempero (OBOUAYEBA *et al.*, 2014; ZHEN *et al.*, 2016).

O *Hibiscus sabdariffa* L., dentre os seus inúmeros benefícios, pode ser utilizado em sistemas alimentares para prevenir a contaminação bacteriana (MACIEL, 2012).

Alguns autores, como Chao e Yin (2009), relatam uma possível relação entre a quantidade de antocianinas e a atividade antimicrobiana do hibisco.

Diversos estudos de rastreio para os compostos fitoquímicos de *H. Sabdariffa* L são encontrados na literatura (FREITAS; SANTOS; MOREIRA, 2013; OKEREKE; IROKA; CHUKWUMA, 2015; ZHEN *et al.*, 2016), existindo certa variação na composição entre os estudos, provavelmente devido a diferentes variedades, condições genéticas, ambientais, ecológicas e de colheita da planta (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014).

A folha de *Hibiscus sabdariffa* L., possui os ácidos fenólicos e os flavonoides como principais constituintes químicos (RODRÍGUEZ-MEDINA, *et al.*, 2009), sendo três diferentes ácidos isômeros, ácido 3-cafeoilquínico (ácido clorogênico), ácido 4- cafeoilquínico (ácido criptoclorogênico) e ácido 5-cafeoilquínico (ácido neoclorogênico) e os flavonoides, quercetina e kaempferol que possuem atividade anti-inflamatória (RODRÍGUEZ-MEDINA *et al.*, 2009).

Algumas atividades biológicas são atribuídas a extratos deste órgão da planta, tais como: atividade antioxidante moderada, anti-hiperlipidêmica, antiaterosclerótica, antiproliferativa (ZHEN *et al.*, 2016).

Os principais constituintes da planta com aplicações registradas no contexto farmacológico são os ácidos orgânicos, flavonoides, polissacarídeos e antocianinas, estando os dois últimos mais presentes nos cálices secos da espécie (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014).

O potencial antioxidante relaciona-se com uma capacidade protetora contra o dano oxidativo que é causado por um desequilíbrio entre produção e acumulação de espécies reativas ao oxigênio (EROs) em células e tecidos e a capacidade de desintoxicação do sistema biológico. As EROs estão bastante associadas ao desenvolvimento e progressão de diversas condições patológicas, tais como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (PARHIZ *et al.*, 2015; PIZZINO *et al.*, 2017).

3.2 Hibiscos - Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos possuem em sua estrutura pelo menos um anel aromático onde ao menos um hidrogênio é substituído por uma hidroxila (VACCARI; SOCCOL; IDE, 2009).

Os compostos fenólicos podem ser pigmentos, devido a reação de defesa das plantas contra agressões do ambiente o que resulta na aparência colorida dos alimentos, eles agem como antioxidantes devido a sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons e por possuir radicais intermediários estáveis, o que impede a oxidação de vários ingredientes do alimento, principalmente lipídios. (SANTOS; VEGGI; MEIRELES, 2010; SILVA *et al.*, 2010; VIZZOTTO; KROLOW; WEBER, 2010).

A presença de compostos fenólicos nos alimentos, tais como flavonoides, ácidos fenólicos e antocianinas, vitaminas C, E e carotenoides, contribuem para os efeitos benéficos destes alimentos (LINARES *et al.*, 2015).

Entre os compostos fenólicos, os que mais se destacam são os flavonóides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (ANGELO; JORGE, 2007).

Esta classe de compostos também pode ser simplesmente dividida em flavonoides ou polifenóis (catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas), um grupo amplamente distribuído nas frutas e nos vegetais, e os não-flavonoides (fenóis simples ou ácidos) (ANGELO; JORGE, 2007; SILVA *et al.*, 2010).

Os flavonoides são bem conhecidos pela sua atividade anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, citotóxica e são bem usados no tratamento de diabetes, hipertensão e febre reumática (AKANBI *et al.*, 2009).

Este grupo de substâncias são classificados de acordo com a configuração do esqueleto principal (Tabela 1) a maioria é encontrada na natureza em forma de ésteres e heterodídeos, sendo, portanto, solúveis em água e em diversos solventes polares (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007).

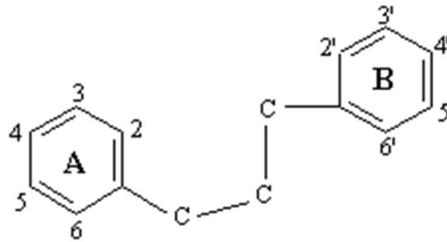
Tabela 1 - Classificação dos Compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico

Esqueleto básico	Classe de compostos fenólicos
C6	Fenóis simples e benzoquinonas
C6 - C1	Ácidos fenólicos
C6 - C2	Acetofenonas e ácidos fenilacéticos
C6 - C3	Fenilpropanóides: ácidos cinâmicos e compostos análogos, fenil propenos, cumarinas, isocumarinas e cromonas
C6 - C4	Naftoquinonas
C6 - C1 - C6	Xantonas
C6 - C2 - C6	Estilbenos e antraquinonas
C6 - C3 - C6	Flavonóides e isoflavonóides
(C6 - C3)2	Lingnanas
(C6 - C2 - C6)2	Diflavonóides
(C6)n	Melaninas vegetais
(C6 - C3)n	Ligninas
(C6 - C1)n	Taninos hidrolisáveis
(C6 - C3 - C6)n	Taninos condensados

Fonte: Carvalho; Gosmann; Schenkel, 2007

Entre estes compostos, os flavonoides são os mais estudados como antioxidantes, eles têm em comum a estrutura C6-C3-C6, sua estrutura básica é composta por dois anéis aromáticos (Figura 2), que geralmente contém um átomo de oxigênio, ligados por uma cadeia alifática de três carbonos (CARVALHO; GOSMANN; SCHENKEL, 2007; CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007). Flavonoides estão presentes em frutas vermelhas ou *berries* (como uvas, mirtilo, framboesa, ameixa e cereja, por exemplo), em vegetais folhosos, raízes, tubérculos, bulbos, ervas, temperos, legumes, chá, café, cacau e vinho (VACCARI; SOCCOL; IDE, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2010; SILVA *et al.*, 2010; SALGADO; MORZELLE, 2017).

Figura 2 - Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: Carvalho; Gosmann; Schenkel, 2007.

As antocianinas (Figura 3) são compostos fenólicos, pertencentes ao grupo dos flavonoides. O termo antocianina, derivado do grego de flor e azul (anthos = flores; kianos = azul), foi inventado por Marquart em 1853 para se referir aos pigmentos azuis das flores. Percebeu-se mais tarde que não apenas a cor azul, mas também várias outras cores observadas em flores, frutos, folhas, caules e raízes são atribuídas a pigmentos quimicamente similares aos que deram origem a “flor azul” (BROUILLARD, 1982; LIMA *et al.*, 2003).

As antocianinas compõem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal encontrados no fluído da célula vegetal, que geralmente apresenta pH levemente ácido. De modo geral, em meio extremamente ácido (pH entre 1-2), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada devido ao predomínio da forma cátion flavílico (AH⁺). São responsáveis pela coloração vermelha intensa da extração obtida a partir de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. mas, são instáveis durante condições de processamento e armazenamento (MARÇO; SCARMINIO, 2008; AISHAH *et al.*, 2013).

Esses pigmentos estão amplamente difundidos no reino vegetal, apresentando diferentes tonalidades de cor que oscilam entre vermelho, laranja e roxo. Ocorrem geralmente na forma de antocianinas, derivadas das antocianidinas (BROUILLARD, 1982; TEIXEIRA *et al.*, 2008).

As antocianinas representam uma alternativa importante para a substituição gradativa dos corantes sintéticos, pois são abundantes na natureza, apresentam um amplo espectro de cores e, também devido aos efeitos benéficos à saúde humana. Avaliar a potencialidade dos processos de extração, purificação e utilização em alimentos permanece ainda um campo aberto à investigação científica (LOPES *et al.*, 2012).

Figura 3 - Estrutura dos principais compostos antociânicos



Fonte: Vaccari; Soccol; Ide (2009). Adaptado

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas, entretanto, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu está entre as mais utilizadas (EVERETTE *et al.*, 2010; WOOTTON-BEARD *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2014).

Estudos etnobotânicos têm demonstrado que espécies de Malvaceae frequentemente são usadas na medicina tradicional para tratar enfermidades tais como malária, varíola, que apresentam febre e dor, e também por possuir muitas propriedades bioativas, tais como propriedades hepatoprotetora, antitumoral, antihiperlipidêmico, anti-inflamatórias, antivirais e propriedades antioxidante e antibacterianas (KIESSOUN *et al.*, 2010; LIN *et al.*, 2012; MEHDI *et al.*, 2013).

Considerando que substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos, os resultados descritos em vários trabalhos estimulam a continuidade dos estudos para avaliar a ação antioxidante de substâncias isoladas de espécies de plantas medicinais, condimentares ou aromáticas (ALVES *et al.*, 2010; WOOTTOM-BEARD *et al.*, 2011; MACIEL *et al.*, 2012; YANG *et al.*, 2014).

Os extratos obtidos dos cálices de hibisco contribuem ativamente para esses efeitos pois, são conhecidos por conter muitos constituintes químicos incluindo alcaloides, ácido L-ascórbico, ácido cítrico, quercetina, antocianina e flavonoides, assim como são ricos em minerais como cálcio, magnésio, ferro, potássio e sódio (HERNÁNDEZ *et al.*, 2009; ANOMOHANRAN, 2014; PETER *et al.*, 2014).

Levando em consideração os atributos apontados pelos estudos acima, a parte importante da planta são as sépalas que cercam o fruto e formam os cálices mas, as folhas, caules, raízes, sementes também são usados para diferentes fins em alimentos, farmacêutico, aplicações industriais. Cálices vermelhos são utilizados para produção de geleias, bebidas, molhos, corantes e conservas alimentares (ABO-BAKER; MOSTADA, 2011; ANOMOHANRAN, 2014).

4 MATERIAL E METODOS

4.1 Coleta e Classificação do Material

As folhas da planta *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus (vinagreira) (figura 4) foram coletadas durante os meses de junho e julho de 2021 em área particular na cidade de São Luís, 2°35'21.9"S 44°12'19.0"W onde havia abundância da espécie para que, se necessário, realizar novas coletas.

Figura 4 - *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus

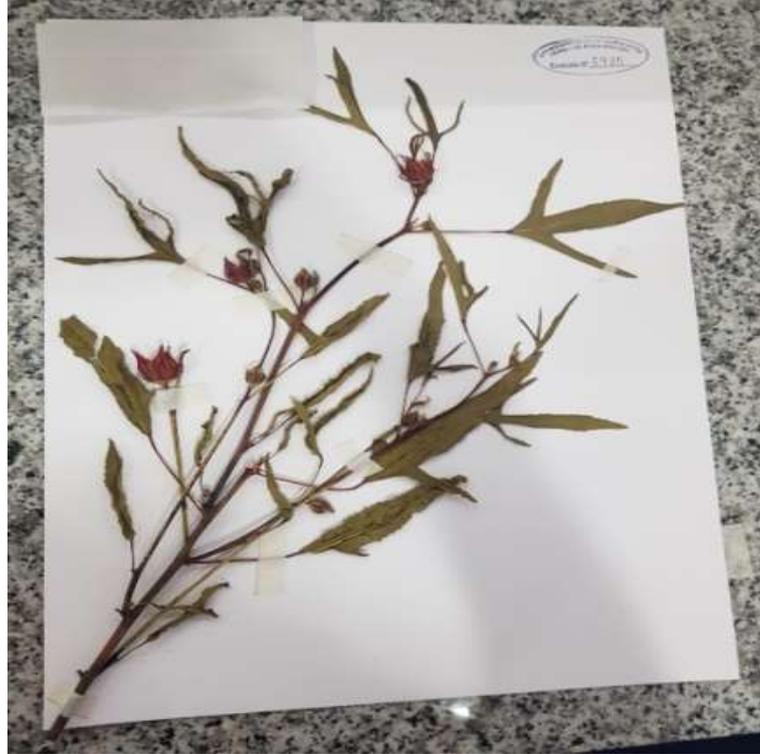


Fonte: Elaborado pelo próprio Autor, 2021

Foram utilizados na coleta, os seguintes materiais auxiliares: tesoura para poda, pranchetas, papel para anotação, canetas e sacos de papel. Os espécimes coletados foram colocados entre folhas de jornal e papelão, com a identificação da data e as iniciais do coletor. Em seguida, foram fechados em prensa de madeira e amarradas com o auxílio de cordas e enviadas para o Herbário Rosa Maria Mochel localizado na Universidade Estadual do Maranhão, onde foram identificadas recebendo a numeração de exsicata 5935 (figura 5).

O material vegetal coletado e identificado foi enviado para o Núcleo de Ciência e Tecnologia de Alimentos do Instituto de Pesquisas Científicas e Tecnológicas do Estado do Amapá - IEPA, onde os experimentos foram realizados.

Figura 5 - Exsicata *Hibiscus sabdariffa* Linnaeus



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

4.2 Caracterização Físico-Química das partes Aéreas do *Hibiscus*

Os métodos físico-químicos foram baseados nas metodologias do Instituto Adolfo Lutz (2008) e A.O.A.C. (1995), obedecendo aos protocolos padrões do Núcleo de Ciência e Tecnologia de Alimentos – NUCTAL/IEPA. Foram realizadas as seguintes análises físico-químicas:

4.2.1 Cinzas

Para a realização da análise de cinzas (Figura 6), foi utilizado o forno mufla da marca QUIMIS®, MODELO Q-318 D21.

Inicialmente os cadinhos de porcelanas que foram utilizados nas análises foram aquecidos em forno mufla a 550°C por uma hora, e em seguida resfriado em dessecador até a temperatura ambiente, após essa etapa, foram pesados 5g da amostra nos cadinhos de porcelana e em seguida incinerados em forno mufla a 550°C, pelo período de 3 horas e resfriados em

dessecador até a temperatura ambiente para pesagem. O percentual de cinzas foi calculado de acordo com a Equação 1.

$$\text{Cinzas (\%)} = \frac{(\text{Massa Final do Cad.} - \text{Massa Inicial do Cad.}) \times 100}{\text{Massa da Amostra}} \quad \text{Eq. 1.}$$

Figura 6 - Análise de Cinzas



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

4.2.2 Umidade

A determinação de umidade foi determinada pelo método de secagem em estufa com circulação de ar, até as cápsulas de porcelanas atingirem o peso constante, a estufa utilizada foi da marca QUIMIS®, modelo Q-317 B222.

As cápsulas de porcelana utilizadas nessa análise passaram por um pré-tratamento, onde foram aquecidos em estufa a 105 °C por uma horas, e resfriados em dessecador até temperatura ambiente.

A análise iniciou pesando-se 5 gramas da amostra em capsulas de porcelanas e levadas para a estufa a 105° C durante 3 horas. Logo em seguida, as amostras foram esfriadas em dessecador até temperatura ambiente. A operação foi repetida até peso constante. O cálculo da umidade foi realizado de acordo com a equações 2 e 3.

$$\text{Massa seca \%} = \frac{(\text{Massa Final da Cap.} - \text{Massa Inicial da Cap.}) \times 100}{\text{Massa da Amostra}} \quad \text{Eq. 2.}$$

$$\text{Umidade (\%)} = 100 - \text{Massa Seca (\%)} \quad \text{Eq. 3.}$$

4.2.3 Proteínas

As proteínas foram determinadas pelo método de kjeldahl, realizada através da digestão, destilação e titulação da amostra que determinou o nitrogênio total, no aparelho da marca TECNAL, modelo TE 036/1 (ADOLFO LUTZ, 2008).

Foram pesados 1,5g da mistura catalítica (dióxido de selênio, sulfato de cobre e sulfato de sódio) em papel manteiga e 0,2g da amostra e colocado no tubo de kjeldahl (Figura 7). Em seguida, foi levado ao bloco digestor e adicionando 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, aumentando a temperatura gradativamente. Os tubos foram retirados do bloco digestor após a solução ficar com tonalidade clara (coloração azul-cristal). Foram esfriados por uma hora, e depois adicionado água destilada, escorrendo lentamente pela parede do tubo, de modo a dobrar o volume inicial.

Para a destilação, foram adicionados a um erlenmeyer 20 mL de ácido bórico e 3 gotas de indicador misto (vermelho de metila e verde de bromocresol). Ao tubo previamente preparado, foi adicionado 25 mL de hidróxido de sódio (NaOH) a 50%, de modo a deixar a coloração negra e em seguida, destilado a reação no erlenmeyer para a remoção do nitrogênio.

A titulação foi realizada com ácido clorídrico (HCl) 0,1 Mol/L e aplicada as equações 4 e 5.

$$\text{Nitrogênio total (\%)} = \frac{0,14 \times Vg \times \text{Fator de Correção}}{\text{Massa da Amostra}} \quad \text{Eq. 4.}$$

$$\text{Proteína (\%)} = \text{nitrogênio (\%)} \times 5,75 \quad \text{Eq. 5.}$$

Onde:

Vg= volumes gasto de HCl 0,1 Mol/L

Fator de correção= fator de correção do HCl 0,1 Mol/L

5,75 = fator de conversão para proteína vegetal.

Fc = 0,99

Figura 7 - Determinação de proteína pelo método de kjeldahl.



Fonte: Elaborado pelo próprio autor (2021).

4.2.4 Ácido Ascórbico

Para a preparação do extrato, tomou-se 5g da amostra, sendo protegida da luz e oxigenação por papel alumínio. Utilizou-se ± 30 mL de ácido oxálico 0,5% (refrigerado) e foi completado para 100 mL em um balão volumétrico com ácido oxálico 0,5%.

Para a padronização da solução do tillman com 0,2% Ácido ascórbico (AA), foi medido 5 mL da solução de AA (50 $\mu\text{g/mL}$) em erlenmeyer de 125 mL, e adicionado água destilada até completar ± 50 mL e foi titulado com a solução de Tillman refrigerada, até o ponto de viragem, róseo claro, persistente por 15 segundos, Descrito por AOAC (1995), modificado por Banassi et al (1988) que substituiu o ácido meta fosfórico por ácido oxálico. O cálculo do teor de ácido ascórbico foi realizado de acordo com a equação 6.

$$C' = \frac{\text{Teor de ác.ascórbico-umidad}}{100\text{g}} \quad \text{Eq. 6.}$$

4.2.5 Lipídios

Para determinação do teor de lipídios foi pesado em torno de 2 a 5g de amostra finamente moída em um cartucho de Soxhlet previamente preparado com papel filtro e algodão (anotado o peso), em seguida com o auxílio de uma pinça o cartucho foi preenchido com algodão até cobrir toda a amostra e levado a estufa a 105°C , por 2 horas.

Um balão de fundo chato com boca esmerilhada e com pérolas de ebulição, já previamente seco (em estufa a 105°C por no mínimo 2h), foi retirado da estufa com o auxílio de uma tenaz e colocado em dessecador por 20-30 min. (anotado o peso).

Após a secagem o cartucho foi colocado dentro do extrator de Soxhlet e conectado o extrator de Soxhlet ao balão e foi adicionado 250mL de éter de petróleo em seguida foi conectado o conjunto ao condensador.

A chapa aquecedora foi ligada e foi mantido o aquecimento por um período de 8 horas após início da fervura, com velocidade de gotejamento de 4 a 5 gotas por segundo. Após as 8 horas o conjunto foi retirado, tomando o cuidado para remover o máximo de éter do balão antes.

O balão foi colocado na estufa a 105°C, por 1h e em seguida resfriado em dessecador e pesado. Para os cálculos foi utilizada a Equação 7.

$$\text{LIPÍDIOS (\%)} = \frac{\text{PL} \times 100}{\text{M}} \quad \text{Eq. 7.}$$

PL = Peso do balão com gordura – Peso do balão antes da extração

M = massa da amostra

4.3 Preparo dos Extratos e Extração dos Óleos

Para a preparação do extrato, as folhas foram secas em estufa a 55° por 72h e, após a secagem, trituradas em moinho de facas para obtenção de um pó fino. O extrato hidroetanólico foi obtido pelo método de maceração em álcool 70% na proporção de 1:5 (p/v), aguardando 15 dias em maceração para posterior filtração em papel filtro e posterior evaporação do solvente com auxílio de um rotaevaporador da marca Fisatom 802, para a obtenção do extrato hidroetanólica (70%).

O líquido extrator foi eliminado na sua proporção de 88,2% da graduação total inicialmente, restando o extrato no frasco de evaporação (12,2%), que apresentou características de um líquido viscoso. O extrato final da TM obtida foi envasado em frasco de vidro âmbar, armazenado e conservado em geladeira vertical frost free a 4±1°C.

O fracionamento líquido-líquido foi realizado com a adição de acetato de etila e diclorometano, que após a extração, os solventes também foram eliminados com o auxílio do rotaevaporador

4.4 Screening fitoquímico com a utilização da Cromatografia em Coluna (CC)

Para o Screening fitoquímico, foi utilizada a Cromatografia em coluna (CC) em sílica gel 60F tendo como fase móvel os solventes: hexano e acetato de etila nas proporções 8:2, 1:1, 2:8, acetato de etila e metanol 6:4. (Carvalho et al., 2013; Costa, 1972; Collins et. al., 1997)

A análise por cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada com as frações da extração líquido-líquido e com as frações da cromatografia em coluna, sendo comparado com o padrão quercetina. Os eluentes utilizados foram clorofórmio: acetato de etila (60:40), acetato de etila: metanol (60:40), e acetato de etila: metanol : água (100: 13,5:10). As placas cromatográficas foram analisadas em lâmpada de UV no comprimento de onda 365 nm, algumas placas foram reveladas com revelador anisaldeído. (Carvalho et al., 2013; Collins et. al., 1997)

Foi realizado o método de Folin Ciocalteu com o intuito de determinar os níveis de polifenóis totais, onde a curva padrão foi produzida utilizando soluções de ácido gálico nas concentrações de 250, 200, 150, 100 e 50 mg/L e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 765 nm. Foram analisados o extrato hidroetanólica (70%), a fração diclorometânica e a fração de acetato de etila.

O método colorimétrico de Cloreto de Alumínio foi a técnica escolhida para determinar o doseamento de flavonóides, onde a curva padrão foi realizada com soluções de quercetina nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 415 nm. As amostras analisadas foram o extrato hidroetanólica (70%), fração diclorometânica e fração de acetato de etila. (COLLINS *et al.*, 1997; CARVALHO *et al.*, 2013;)

4.5 Preparação do Inóculo para Teste de Sensibilidade aos Antimicrobianos

Para padronizar a densidade do inóculo para o teste de sensibilidade aos antimicrobianos, foi utilizado um controle de turbidez de BaSO₄, equivalente a uma solução padrão McFarland de 0,5. Para a avaliação da concentração inibitória mínima da cultura inicial em ágar Mueller-Hinton (MH) incubado a 37±1°C por 24 horas, foram selecionadas três a cinco colônias bem isoladas e transferidas para um tubo contendo 4-5 mL de solução salina, realizando uma suspensão direta e a turbidez foi ajustada com acréscimo da própria solução até obter turbidez óptica comparável a solução padrão McFarland de 0,5, utilizando-se

espectrofotômetro resultando numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2 x 10⁸ UFC/mL (CLSI, 2015).

4.5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana da fração hidroetanólica em acetato de etila e diclorometano de vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.) pelo teste de disco-difusão em ágar

Foi avaliada a suscetibilidade antimicrobiana de acordo com o método de disco-difusão, conforme recomendado pela Clinical & Laboratory Standards Institute - CLSI (2015) com adaptações. Discos estéreis de papel Whatmann 3 (6 mm) receberam uma alíquota de 5 µL das frações. Também foi utilizado como controle negativo um disco branco (sem antimicrobiano), e como controle positivo um disco contendo antibiótico para cada microrganismo testado. Os discos foram dispensados, com a utilização de uma pinça estéril, na superfície da placa contendo Ágar Mueller-Hinton, após a aplicação do inóculo bacteriano, e incubadas a 36±1°C por 24 horas. Os resultados foram analisados medindo-se o halo de inibição de crescimento microbiano, com o auxílio de uma régua milimetrada.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Análise da composição centesimal

Os resultados da análise físico-química do extrato de hibisco, encontram-se na tabela 02, onde são apresentados os resultados para os seguintes parâmetros: umidade, proteína, lipídios, cinzas e o teor de Ácido Ascórbico, as análises foram realizadas em triplicatas.

Tabela 2 - Valores da composição centesimal das folhas de vinagreira, São Luís, 2021

Amostras	UMD (%)	PT (%)	L (%)	CZ (%)	AA (mg/100g)
V1	81 ^a	4,22 ^a	0,55 ^a	1,67	38,74 ^a
V2	83 ^a	4,55 ^a	0,85 ^a	1,57	38,24 ^a
V3	83 ^a	4,77 ^a	0,92 ^a	1,49	37,94 ^a
Média	82,33	4,51	0,77	1,576	38,31
DP	1,15	0,28	0,20	0,09	0,40

UMD = Umidade; PT = Proteína total; L= Lipídios); CZ = Cinzas; AA = Ácido Ascórbico; DP = Desvio Padrão.

A umidade e o teor de lipídios são grandezas complementares (QUEIROZ, 2012). Não se observou diferença mínima significativa para esse quesito. O teor de umidade constitui um importante fator quanto à estabilidade de uma matéria-prima, o resultado médio encontrado 82,33% para as folhas de vinagreira não difere muito do resultado encontrado na Tabela ENDEF/IBGE (1999) em que o percentual de umidade teve com média 85,6%. Em pesquisa realizada pelo Instituto de Geografia e Estatística IBGE, um valor semelhante foi encontrado na análise da folha, apresentando uma média de 85,6%. De acordo com Andrade (2006) o teor de umidade permite classificar esta hortaliça como perecível e conseqüentemente com reduzido tempo de prateleira, quando armazenada em temperatura ambiente.

Os valores de proteínas encontrados na folha de vinagreira foram de 4,22%, 4,55% e 4,77%. Estes valores não diferem ao encontrado pela tabela ENDEF/ IBGE (1999), em que o percentual de proteínas teve como media 3.3%.

Proteínas nas folhas não apresentaram diferença significativa. Os valores encontrados (4,51%) no presente estudo são muito inferiores aos relatados para espinafre

(*Tetragonia expansa* Murr) (24,7%) e urtiga-mansa (*Phenaxuli ginusus* Wedd.) (24,2%) (SANTOS *et al.*, 2011). As proteínas nas folhas são um dos constituintes de maior interesse do ponto de vista nutricional.

O teor de proteína foi de 4,51 g, bem superior quando comparado aos valores encontrados em outras hortaliças folhosas como rúcula 2,58 g/100g, couve-de-bruxelas 4,9 g, couve 3,6g por 100 g da parte comestível.

A amostra apresentou resultados de 0,55%, 0,85% e 0,92%. Porém, quando comparados com a literatura, com a Tabela ENDEF/IBGE (1999) estes teores mostram-se superiores. Nesse estudo, foi encontrada na folha de vinagreira uma média de 0.77% de lipídios.

Na determinação de cinza ou resíduo mineral fixo a amostra de vinagreira apresentou média de 1,57 %. Segundo Souza *et al.* (1998) a fração de cinza corresponde ao resíduo inorgânico que pode permitir uma estimativa da riqueza de alguns minerais em alimentos analisados, porém em produtos vegetais tem relativa pouca expressão, visto que sua composição é muito variável.

O teor de cinzas nas folhas de vinagreira foi inferior aos encontrados para alface-americana (*Lactuca sativa* L.) (9,1%), couve-manteiga (*B. oleracea* var. *acefala*) (11,2%) e espinafre (*Tetragonia expansa* Murr.) (14,3%). No entanto, o teor de cinzas merece destaque, pois há um resíduo mineral fixo interessante nas folhas, indicando que podem ser uma fonte importante de minerais para o organismo humano, como o cálcio (QUEIROZ, 2012)

Ácido ascórbico tem grande relevância tanto no aspecto nutricional quanto na manutenção da qualidade do produto, pois confere certa proteção contra o escurecimento interno (ANDRADE, 1999).

Assim como para os demais constituintes analisados, não houve diferença significativa para o teor de vitamina C, que variou de 38,74 mg 100 g⁻¹ a 38,24 mg 100 g⁻¹, Esses valores ficaram acima dos relatados para as folhas de beldroega (*Portulaca oleracea* L.), as quais apresentaram teores superiores a 21,48 mg 100 g⁻¹ (QUEIROZ, 2012).

O ácido Ascórbico auxilia na biodisponibilidade do ferro também presente nos vegetais em uma forma que possa ser absorvida pelo organismo. O baixo consumo de alimentos fontes de vitamina C propicia o aparecimento da deficiência de ferro, contribuindo assim para o aparecimento da anemia ferropriva, patologia comum entre as crianças, constituindo-se um dos principais problemas de saúde infantil, principalmente no nordeste brasileiro. Por isso a presença de alimentos fontes de vitamina C nas refeições merece destaque (COSTA *et al.*, 2001).

As diferenças observadas podem estar relacionadas com a produção de diferentes metabólitos em resposta a mudanças ambientais, de modo que o mesmo espécies de plantas cultivadas em diferentes áreas geográficas podem produzir diferentes compostos (Santos, Manuela e Saraiva, 2016)

5.2 - Atividade antimicrobiana da fração hidroalcoólico em acetato de etila e diclorometano de vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.) frente cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

O hibisco dentre os seus inúmeros benefícios, pode ser utilizado em sistemas alimentares para prevenir a contaminação bacteriana. A análise da sensibilidade das bactérias testadas frente a solução antimicrobiana alcoólica das partes aéreas de hibisco, obtida com dois diferentes solventes, apresentou diferença significativa entre as bactérias confrontadas, como pode ser visto na Tabela 3. Para diluição das amostras foi utilizado água com tween 80 a 3%, sendo esta a melhor concentração utilizada para diluir as amostras sem interferir nos resultados, esta solução foi utilizado como controle negativo e os testes foram realizados em duplicata.

Tabela 3 - Resultado da medição dos halos de inibição em mm da fração de acetato de etila frente as cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, São Luis, 2021.

Amostra	Concentração	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>S. aureus</i>
Controle+	30 mg	30 mm	17 mm	24 mm
Controle -	-	0 mm	0 mm	0 mm
Acetato de Etila	5 μ L	6 mm	10 mm	25 mm
Diclorometano	5 μ L	0 mm	0 mm	0 mm

Padrão +: Ceftriaxona 30mg ; Controle - : Água e tensoativo

As análises foram realizadas utilizando como padrão o antibiótico Ceftriaxona, frente as cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*. As análises realizadas com a fração de acetato de etila mostrou um bom resultado frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, porém não apresentou resultados satisfatórios frente as cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa*, para esse solvente diferente do resultado encontrado Chao e Yin (2009), que em sua pesquisa relatou que

o extrato etanólico de cálices de hibisco inibiu bactérias degradantes de alimentos (*S. typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *B. cereus*), pode-se observar que as partes utilizadas na elaboração do extrato, tem grande influência no resultado, pois no seu estudo, o autor utilizou os cálices do hibisco e no presente trabalho os extratos foram elaborados com as partes aéreas do hibisco.

Em relação ao perfil fitoquímico, as frações utilizadas não possuem tais compostos, como os demais extratos que demonstraram atividade, portanto a ausência destes componentes pode também justificar sua ineficácia.

As análises utilizando a fração de diclorometano, não apresentou resultado satisfatório frente as cepas estudadas.

Borras-Linares *et al.* (2015), relataram a atividade antibacteriano dos extratos etanólicos de 25 variedades de vinagreira contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e destaca que os extratos foram mais eficazes contra bactérias Gram-positivas.

Segundo Maciel *et al.* (2012), o hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.), além de possuir propriedades antioxidantes e antimicrobianas é utilizado como planta medicinal e alimento funcional em países tropicais.

Olaleye (2007), analisou o extrato alcoólico *Hibiscus sabdariffa* L como agente antibacteriano, onde o extrato obteve um excelente resultado frente aos microrganismos testados: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marsecences*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescense*.

Jabeur *et al.* (2017), avaliaram comparativamente a atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico liofilizado e infusão de *Hibiscus sabdariffa* L. Eles usaram 10 mg /mL do extrato de hidroetanol e infusão, respectivamente para ensaios antimicrobianos. A atividade antibacteriana, foi realizada em bactérias Gram positivas e Gram negativas e para a atividade antifúngica *Trichoderma viride* e foram usados quatro espécies diferentes de *Aspergillus*. Eles relataram que o extrato hidroetanólico tinha o mesmo efeito bactericida para todas as bactérias testadas em comparação com a infusão em que nenhuma atividade inibidora de crescimento foi observada contra *Bacillus cereus*, *Micrococcus flavus* e *Escherichia coli* e sem efeito bactericida em *Enterobacter cloacae*, apesar da capacidade de inibir seu crescimento. Eles justificaram seu resultado explicando a diferença nas concentrações dos compostos fenólicos presentes em ambos os extratos e destacou que ambas as propriedades antibacterianas e antifúngicas revelaram uma similaridade faixa de concentração de inibição.

Existem relatos anteriores sobre a atividade antimicrobiana de extratos de cálice de *H. Sabdariffa* obtidos com diversos tipos de extratos. Higginbotham, *et al.*, (2014) avaliaram o potencial antimicrobiano de extratos aquosos, enquanto BorrásLinares *et al.*, (2015) utilizou um extrato etanólico acidificado, e Abdallah (2016) testou esta ação em extratos metanólicos. Além disso, Wong, Lim e Chan (2010) também descreveram sua atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, usando extratos metanólicos de folhas e cálices de diferentes espécies de *Hibiscus*.

Elmanama, Alyazji e Abu-Gheneima (2011) estudaram os extratos de metanol e água de *H. sabdariffa*, obtido por extração de Soxhlet, contra um painel de fungos e bactérias, revelando maior efeito antifúngico. Em suma, as propriedades antimicrobianas dos cálices de *H. sabdariffa* podem ser atribuídas ao riqueza em metabólitos fitoquímicos, como ácidos fenólicos (ácido protocatecuico) e antocianinas (delfinidina-3-O-sambubiósido e cianidina-3-O-sambubiósido), bem como descrito por outros autores (LIU; TSAO; YIN, 2005; GUTIÉRREZ-ALCÁNTARA *et al.*, 2016).

5.3 Análise fitoquímica da fração hidroetanólica em acetato de etila e diclorometano de vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.)

O processo de extração foi realizado pela técnica de maceração onde se obteve um rendimento de 12,2% da fração do extrato hidroetanólico (70%) e fracionamento líquido-líquido realizado com 8 g de extrato mole hidroetanólico em acetato de etila com rendimento de 1,621 g; e em diclorometano com rendimento de 0,328 g.

Os resultados das análises realizadas na fração de acetato de etila e diclorometano encontram-se na Tabela 4. Em ambas as frações foi identificada a presença de substâncias fenólicas, flavonoides e cumarinas. Os melhores resultados de rendimentos das frações podem ser observados na fração de acetato de etila submetidos à extração líquido/líquido. Neste sentido, é possível sugerir que nessa fração de acetato de etila, existe a presença de compostos de maior polaridade, podendo apresentar maior potencial antioxidante.

Tabela 4 – Resultados das reações Reações indicativas de substâncias presentes no extrato hidroetanólico de vinagreira nas frações de acetato de etila e diclorometano, São Luís, 2021.

Substâncias	Diclorometano	Ac. de etila	Reações
fenólicas	+	+	Cloreto férrico; Hidróxido de potássio
Flavonóides	+	+	Óxido de magnésio; Ácido clorídrico
Taninos	-	+	Cloreto férrico; Solução de gelatina
Cumarinas	+	+	Reativo de KOH; Visualização UV
Alcalóides	-	-	Reativo de Mayer
Heterosídeos	-	-	Reativo de Bertrand
cardiotônicos	-	+	Reação de Baljet
	-	+	Reação de Keller-Kiliani

(+) resultado positivo para reação; (-) resultado negativo para reação

As antocianinas compõe subgrupo de flavonóides, sendo os principais constituintes bioativos de *Hibiscus sabdariffa* L. (MACIEL *et al*, 2012; IBRAHIM; BUSRA, 2014). Essas substâncias são encontradas principalmente nos cálices, além de estarem presentes nas folhas, assim como outros compostos fenólicos bioativos, sugerindo serem precursores na atividade antioxidante.

Peng *et al.* (2011) indentificaram compostos fenólicos no extrato metanólico de cálice seco de *H. sabdariffa*. Beltran-Debon *et al.* (2010), relataram a presença de Quercetina-3-O-glucosídeo em infusões preparadas a partir do cálices de *H. sabdariffa*, Herranz-López *et al.* (2012) relataram a presença de Kaempferol-3-O-rutinosídeo em extratos aquosos e etanólicos preparados a partir de cálices secos de *H. sabdariffa*.

O extrato alcoólico das partes aéreas do hibisco possui antocianinas e polifenóis totais, indo ao encontro do que foi citado por Sáyago-Ayerdi *et al.* (2007); Tsai *et al.* (2002); Lai *et al.* (1991) quando relacionaram a alta concentração de antocianinas nos cálices do hibisco com uma boa fonte de antioxidante, devido aos seus compostos fenólicos.

Aurélio *et al.* (2008), relataram que os extratos de cálices de hibiscus são ricos em antocianinas como delfinidina-3-glucosídeo, sambubiosídeo e cianidina-3-sambubiosídeo contribuindo para suas propriedades antioxidantes, eles usaram

principalmente um solvente aquoso ou orgânico para extrair os polifenóis e antocianinas dos cálices de vinagreira.

Luvonga *et al.* (2010) relataram a presença de compostos fenólicos no extrato de vinagreira. Recentemente, Jabeur *et al.* (2017) em seus estudos identificaram delphinidina-3-O-sambubiosídeo, delphinidina-3-O-glicosídeo e cianidina-3-O-sambubiosídeo.

Camelo-Mendez *et al.* (2013) observaram que o etanol é o melhor solvente para a extração de antocianina, que variou de 17,3 a 32,2 mg de cianidina-3-glicosídeo/g de peso seco nas variedades pigmentadas.

Em um estudo realizado por Freitas, Santos e Moreira (2013), em extratos hidroetanólicos de caules ou folhas de hibisco, foi detectado indicadores positivos de taninos, flavonoides, fenóis e esteroides.

Adamu e Ngwu (2015) realizaram análises em folhas de hibisco, onde foi encontrada a presença de flavonoides, saponinas, esteroides e taninos em extrato metanólico, enquanto Sobota, Pinho e Oliveira (2016), utilizando extratos aquosos ou alcoólicos, obtidos por infusão ou decocto, detectaram apenas cumarinas e flavonoides.

Mohd-Esa *et al.* (2010), avaliaram o teor de compostos fenólicos em amostra de *Hibiscus sabdariffa*, e detectaram que houve variação dos resultados em função da parte da planta (semente, cálice, folhas ou caule) e do tipo de solvente utilizado (metanol a 80% ou água destilada) na obtenção dos extratos, onde os maiores valores encontrados, foram no extrato metanólico de sementes. Formagio *et al.* (2015) afirmam que o teor de fenóis em amostras de hibisco foi maior nos extratos metanólicos de cálices, em comparação aos das folhas.

6 CONCLUSÕES:

Concluiu-se que as partes aéreas de *H. sabdariffa* possuem altos teores de cinzas, umidade e ácido ascórbico, bem como baixos teores de lipídeos e proteínas. A preparação do extrato hidroetanólico teve rendimento total de 12,2%, com melhor rendimento após fracionamento líquido-líquido em acetato de etila. Quanto a atividade antimicrobiana, é possível inferir que apenas a fração de acetato de etila se mostrou eficaz contra *S. aureus*, não apresentando atividade satisfatória contra os outros micro-organismos testados. Em ambas as frações foi identificada a presença de substâncias fenólicas, flavonoides e cumarinas porém, é possível sugerir que na fração de acetato de etila, existe a presença de compostos de maior polaridade, podendo apresentar maior potencial antioxidante.

REFERÊNCIAS

- ABO-BAKER, A.A, MOSTADA, G.G. Effect of bio- and chemical fertilizer on growth, sepals yield and chemical composition of *Hibiscus sabdariffa* at new reclaimed soil of South Valley area. **Asian Journal of Science**, 3, p. 16-25. 2011.
- ADAMU, H.; NGWU, R. O. Phytochemical screening and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L. leaf extracts. **Nigerian Journal of Chemical Research**, v. 20, p. 46-52, 2015.
- AISHAH, B., NURSABRINA, M., NORIHAM, A., NORIZZAH, A.R. AND MOHAMAD SHAHRIMI, H. Anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*, *Melastoma malabathricum* and *Ipomoea batatas* and its color properties. *International Food Research Journal* 20(2): 827-834 (2013)
- AKANBI, W. B.; OLANIYAN, A. B.; TOGUN, A. O.; ILUPEJU, A. E. O.; OLANIRAN, O. A. The effect of organic and inorganic fertilizer on growth, calyx yield and quality of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture**, v. 3, n. 4, p. 652-657, 2009.
- ALVES CQ, DAVID JM, DAVID JP, BAHIA MV, AGUIAR RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim Nova**.33(10). p. 2202-10. 2010.
- ANDRADE, E. C. B. **Análise de alimentos: uma visão química da Nutrição**. São Paulo: Livraria Varela, 2006. 203p.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos - uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANOMOHANRAN, EGUONO ESTHER. Evaluating the Viability of Lactic Acid Bacteria and Nutritional Quality of *Hibiscus Sabdariffa* Stored Under Natural Condition. **International Journal of Biology**, 7 (1), p. 116, 2014.
- AURELIO, D. R.G. EDGARDO, S. NAVARRO-GALINDO, Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. 'Criollo') infusion, *Int. J. Food Sci. Technol.* 43 (2) (2008) 322–325.
- BORRÁS-LINARES, I.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; ARRÁEZ-ROMANA, D.; PALMEROS-SUÁREZ, P. A.; DEL VAL-DÍAZC, R.; ANDRADE-GONZÁLESC, I.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; GÓMEZ-LEYVAC, J. F.; SEGURA-CARRETERO, A. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 385-394, 2015.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Informe técnico n° 45*, de 28 de dez. de 2010. Esclarecimentos sobre a regulamentação de chás. 2010.
- BRIDLE, P. & TIMBERLAKE, C.F. Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. **Food Chemistry**, v.58, n.1-2, p.103-109, 1997.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. M. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E., MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 4, p. 902-908, 2007.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P.(Ed) **Anthocyanins as food colors**. London: Academic Press. Cap.1, p.1-40, 1982.

CAMELO-MENDEZ GA, RAGAZZO-SANCHEZ JA, JIMENEZ-APARICIO AR, VANEGAS-ESPINOZA PE, PAREDES-LOPEZ O, DEL VILLAR-MARTINEZ AA. Comparative study of anthocyanin and volatile compounds content of four varieties of Mexican roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) by multivariable analysis. *Plant Food Hum Nutr* 2013. PMID 57882371.

CÂNDIDO, H. T.; STURZA, J. A. I.; BARBOSA, R. C. Colhendo conhecimentos: estudo etnobotânico sobre a vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.) na Universidade Federal de Mato Grosso – Campus Universitário de Rondonópolis, *Cadernos de Agroecologia*, v. 11, n. 2 2017.

CARVALHO, J. C. T; GOSMANN, G.; SCHENKEL, E. . Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: SIMÕES, C. M. O. *et al.* (org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre, RS: UFRS, 2007. p. 519-535.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHAO, C., AND M. YIN. 2009. Antibacterial effects of roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. *Foodborne Pathog. Dis.* 6:201–206.

COSTA, M. J. C; TERTO, A. L. Q; SANTOS, L. M. P; RIVERA, M. A. A; MOURA, L. S. A. Efeito da suplementação com acerola nos níveis sanguíneos de vitamina C e de hemoglobina em crianças pré-escolares. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.14, p.13-20, 2001.

DA-COSTA-ROCHA, I.; BONNLAENDER, B.; SIEVERS, H.; PISCHEL, I.; HEINRICH, M. *Hibiscus sabdariffa* L.–A phytochemical and pharmacological review. **Food Chemistry**, v. 165, p. 424-443, 2014.

ABDELRAOUF A. ELMANAMA , AMANY A. ALYAZJI, NEDAA A. ABU GHENEIMA. Antibacterial, Antifungal and Synergistic Effect of *Lawsonia inermis*, *Punica granatum* and *Hibiscus sabdariffa*. *Annals of Alquds Medicine* Volume/Issue 7:33-41 (1432, 2011)

EVERETTE, J. D., BRYANT, Q. M., GREEN, A. M., ABBEY, Y. A., WANGILA, G. W., WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin–Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(14), p. 8139-8144. 2010.

FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; GÓMEZ-LEYVAC, J. F.; SEGURA-CARRETERO, A. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity

of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 385-394, 2015.

FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Direct characterization of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* using HPLC with diode array detection coupled to ESI and ion trap MS. **Journal Separation Science**, v.32, p. 3441-3448, 2009.

FERREIRA, R. M. A.; FERNANDES, P. L. O.; FONTES, L. . O. .; RODRIGUES, A. P. M. S.; SILVA, L. T. Antioxidantes e sua importância na alimentação. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 5, n. 5, p. 26-30, 2010.

FIRMINO, L. A. - *Avaliação Macroscópica e Microscópica e Características Físico-Químicas no Controle de Qualidade do Chá Verde*. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pósgraduação em Ciência de Alimentos, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA. 2011.

FLAMBÓ DFALP. Atividades biológicas dos flavonoides: atividade antimicrobiana [dissertação]. Porto: Universidade Fernando Pessoa; 2013.

FORMAGIO, A. S. N.; RAMOS, D. D.; VIEIRA, M. C.; RAMALHO, S. R.; SILVA, M. M.; ZÁRATE, N. A. H.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Compostos fenólicos de *Hibiscus sabdariffa* e influência de resíduos orgânicos em sua propriedade antitumoral e antioxidante. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos , v. 75, n. 1, p. 69-76, 2015.

FRANK, T.; NETZEL, G. **Consumption of *Hibiscus sabdariffa* L. aqueous xtractand its impact on systemic antioxidante potential in healthy subjects**, *Wiley Online Library*, 13 February 2012.

FREITAS, N. M.; SANTOS, A. M. C. M.; MOREIRA, L. R. M. O. Avaliação fitoquímica e determinação de minerais em amostras de *Hibiscus sabdariffa* L. (vinagreira). **Cadernos de Pesquisa**, São Luís, v. 20, n. 3, p. 65-72, 2013.

GUTIERREZ-ALCANTARA E.J., CARLOS A. GOMEZ-ALDAPA ALMA D. ROMAN-GUTI ERREZ, ESMERALDA RANGEL-VARGAS, LUIS G. GONZALEZ-OLIVARES and JAVIER CASTRO-ROSAS. Antimicrobial Activity Of Roselle Hibiscus Sabdariffa Calyx Extracts On Culture Media And Carrots Against Multidrug-Resistant Salmonella Strains Isolated From Raw Carrots. *Journal of Food Safety* (2016).

HERNÁNDEZ M. P.; CASTAÑEDA A O.;HERNÁNDEZ P. M.; RODRÍGUEZ J. & GALÁN V. C, “Chemical studies of anthocyanins: A review”, *Food Chem.*, vol. 113, n.o 4, pp. 859-871, 2009. DOI: [http:// dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001](http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.09.001).

HIGGINBOTHAM L. K., BURRIS K. P., ZIVANOVIC S., P. M. DAVIDSON AND C. N. STEWART “Aqueous extracts of *Hibiscus sabdariffa* calyces as an antimicrobial rinse on hot dogs against *Listeria monocytogenes* and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*”. *Food Control*, 2014, 40, 274–277. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2013.12.011>

IBGE. Estudo Nacional da Despesa Familiar - ENDEF. Tabelas de Composição de Alimentos/IBGE. 5ª ed.- Rio de Janeiro: IBGE, 1999.

IBRAHIM, R. e BUSRA, N.N. Physico-Chemical Properties and Sensory Acceptance of Juices Made from. Trans. Malaysian Soc. **Plant Physiol.** 22. First Published, 2014.

I. BORRÁS-LINARES, I.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; ARRÁEZ-ROMANA, D.; PALMEROS-SUÁREZ, P. A.; DEL VAL-DÍAZC, R.; ANDRADE-GONZÁLESC, I.;

I. JABEUR, E. PEREIRA, L. BARROS, R.C. CALHELHA, M. SOKOVIĆ, M.B.P. OLIVEIRA, I.C.F.R. FERREIRA, Hibiscus sabdariffa L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents, Food Res. Int. 100 (2017) 717–723.

JULIANI, H. R.; WELCH, C. R.; WU, Q.; DIOUF, B.; MALAINY, D.; SIMON, J. E. Chemistry and Quality of Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for Developing the Natural-Product Industry in Senegal. **Journal of Food Science**, v.74,n.2, 2009.

LAI, S.; GREY J. I.; SMITH D. M.; BOOREN A. M.; CRACKEL R. L.;BUCKLEY D. J. Effects of oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone, and sodium tripolyphosphate on the development of oxidative rancidity in restructured chicken nuggets. **Journal of Food Science**, v.56, n.3, p.616-620, 1991.

KIESSOUN, K, SOUZA. A, MEDA, N T R, COULIBALY, A Y, KIENDREBEOGO, M, LAMIEN-MEDA, A, LAMIDI, M, MILLOGORASOLODIMBY, J, NACOULMA, O G. Polyphenol contents, antioxidant and anti-inflammatory activities of six Malvaceae species traditionally used to treat hepatitis B in Burkina Faso. **Eur. J. Sci. Res**, 44 (4), p. 570-580. 2010.

LIN, H.; CHAN, K.; SHEU, J.; HSUAN, S.; WANG, C.; CHEN, J. *Hibiscus sabdariffa* leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Food Chem.** 132, p. 880-891. 2012.

LINARES, I. B.; ARROYO, S. F.; ROMAN, D. A.; SUÁREZ, P. A. P.; DÍAZ, R. D. V.; GONZÁLES, I. A.; GUTIÉRREZ, A. F.; LEYVA, J. F. G.; CARRETERO, A. S. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 69, p. 385-394, 2015.

LIU KEH-SEN, TSAO SHYH-MING AND YIN MEI-CHIN. “In vitro Antibacterial Activity of Roselle Calyx and Protocatechuic Acid” Phytotherapy Research Phytother. Res. 19, 942–945 (2005) Published online in Wiley InterScience.

LORENZI, H. & MATOS, F. J. A. **Plantas Mediciniais no Brasil, Nativas e Exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA. São Paulo, 2002.

LUVONGA WAHID A. , M. S. NJOROGE ., A.MAKOKHA AND P.W.NGUNJIRI. “Chemical Characterisation Of Hibiscus Sabdariffa (Roselle) Calyces And Evaluation Of Its Functional Potential In The Food Industry. ”<http://journals.jkuat.ac.ke/index.php/jscp/>
<http://hdl.handle.net/123456789/2947>.

LUZ, F. J. F.; SÁ SOBRINHO, A. F. Vinagreira (*Hibiscus sabdariffa*).In: CARDOSO, M. O. (Coord.) Hortaliças não-convencionais da Amazônia. Brasília:Embrapa – SPI: Manaus:Embrapa CPAA, 1997. p. 63-69.

MACIEL, J.M.; PAIM, P.M.; CARVALHO, C. H. H.; WIEST, M. J. **Avaliação do extrato ácoolico de Hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante.** *Rev. Ins. Adolfo Lutz*, v.71, n.3, p.462-70, 2012.

MARÇO P. H. E SCARMINIO I. S. **Procedimentos Analíticos para Identificação de Antocianinas Presentes em Extratos Naturais.** *Quim. Nova*, Vol. 31, No. 5, 1218-1223, 2008

MARGANHA, E. G.; HALMENSCHLAGER, R. C.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P.; RAMOS, A. L. L. P.; SAFFI, J. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. *Food Chemistry*, v. 118, p. 1–10, 2010.

MARTINS, M. A. S. **Vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.): uma riqueza pouco conhecida.** São Luís: EMAPA, 1985. 12p.

MEHDI ANSARI, TOUBA ESLAMINEJAD, ZARRIN SARHADYNEJAD AND TAHEREH ESLAMINEJAD, “An Overview of the Roselle Plant with Particular Reference to Its Cultivation, Diseases and Usages”, **Europ Jour of Med Plan**, 3(1), p. 135-145, 2013.

MOHD-ESA, N.; HERN, F. S.; ISMAIL, A.; YEE, C. L. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1055-1060, 2010.

MUKHTAR, M. A. The effect of feeding rosella (*Hibiscus sabdariffa*) seed on broiler chick’s performance. **Research Journal of Animal and Veterinary Sciences**, [S. l.], v. 2, p. 21-23, 2007.

OBOUAYEBA, A. P.; DJYH, N. B.; DIABATE, S.; DJAMAN, A. J.; N’GUESSAN, J. D.; KONE, M.; KOUAKOU, T. H. Phytochemical and antioxidant activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) petal extracts. **Research Journal of Pharmaceutical Biological Chemical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 1453-1465, 2014.

OKEREKE, C.; IROKA, F.; CHUKWUMA, M. Phytochemical analysis and medicinal uses of *Hibiscus sabdariffa*. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 2, n. 6, p. 16–19, 2015.

OLALEYE, M. T. **Cytotoxicity and antibacterial activity of Methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*.** *Journal of Medicinal Plants Research*, v.1 n.1, p.009-013,2007.

OLIVEIRA, D. M.; BASTOS, D. H. M. Phenolic acids bioavailability. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

OLIVEIRA, T. T.; TINOCO, A. L. A.; ROSA, C. O. B. Ação Antioxidante dos Flavonóides. In: **Alimentos Funcionais: Componentes bioativos e efeitos fisiológicos.** 1 ed. Rio de Janeiro:Rúbio, 2010. p. 59–79.

OLIVEIRA, C.F.; OLIVEIRA, V.B.; OLIVEIRA, F.F.; MIGUEL, O.G.; MIGUEL, M.D. Parâmetros de controle de qualidade de *Psychotria fractistipula* l. b. sm., Klein & delprete (rubiaceae): umidade, cinzas e prospecção fitoquímica.. *Visão Acadêmica*, Curitiba. v.15, n 4, p.17-23. 2014. ISSN: 1518-8361.

PANIZZA S. Plantas que curam: cheiro de mato. 2. ed. São Paulo: Ibrasa; 1997

PARHIZ, H.; ROOHBAKHSH, A.; SOLTANI, F.; REZAEI, R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 323–331, 2015.

PENG, C.H.; YANG, Y.S.; CHAN, K.C.; WANG, C.J.; CHEN, M.L.; HUANG, C.N. *Hibiscus sabdariffa* polyphenols alleviate insulin resistance and renal epithelial to mesenchymal transition: a novel action mechanism mediated by type 4 dipeptidyl peptidase. **Journal of agricultural and food chemistry**, [Taichung], v. 62(40), p. 9736-9743, 2014.

PETER E., MASHOTO, K. O., RUMISHA, S. F., MALEBO, H. M., SHIJA, A., ORIYO, N. Iron and Ascorbic Acid content in *Hibiscus sabdariffa* Calyces in Tanzania: Modelling and Optimization of Extraction Conditions. **International Journal of Food Science and Nutrition Engineering**, 4(2), p. 27-35, 2014.

PIZZINO, G.; IRRERA, N.; CUCINOTTA, M.; PALLIO, G.; MANNINO, F.; ARCORACI, V.; SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; BRITTO, A. Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–12, 2017.

QUEIROZ, C. R. A. dos A. **Cultivo e composição química de Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) sob déficit hídrico intermitente no solo**. 2012. 144 f. Tese (Doutorado em Agronomia: Ciência do Solo) – Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, SP.

RAMIREZ-RODRIGUES, M. M.; PLAZA, M. L.; AZEREDO, A.; BALABAN, M. O.; MARSHALL, M. R. Physicochemical and phytochemical properties of cold and hot water extraction from *Hibiscus sabdariffa*. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 3, p. 428-435, 2011.

RAMOS, D. D.; VIEIRA, M. C. FORMAGIO, A. S. N.; CARDOSO, C. A. L.; RAMOS, D. D.; CARNEVALI, T. O. Atividade antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1331–1336, 2011.

RIAZ, G.; CHOPRA, R. A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, Amsterdam, v. 102, p. 575-586, 2018.

RODRÍGUEZ-MEDINA, I. C.; BÉLTRAN-DEBÓN, R.; MOLINA, V.M.; LONSO-VILLAVERDE, C.; JOVEN, J.; MENÉNDEZ, J. A.; SEGURA-CARRETERO, A.;

ROSA, E. DA S. R. Características nutricionais e fitoquímicas em diferentes preparações e apresentações de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco, vinagreira, rosela, quiabo-de-angola, caruru-da-guiné) - Malvaceae. 2013. 45f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Nutrição) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

SALGADO, J. M.; MORZELLE, M. C. Flavonoides. In: SALGADO, J. M. **Alimentos funcionais**. 1 ed. São Paulo: Oficina de Textos, 2017. p. 60-83.

SANTOS, D. T.; VEGGI, P. C.; MEIRELES, M. A. A. Extraction of antioxidant compounds from jaboticaba (*Myrciaria cauliflora*) skins: yield, composition and economical evaluation. **Journal of Food Engineering**, Limercik, v. 101, n. 1, p. 23-31, nov. 2010.

SÁYAGO-AYERDI, S.G.; ARRANZ S.; SERRANO J.; et al. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.19, p.7886-7890, 2007.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A. S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenoides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SINDI, H. A.; MARSHALL, L. J.; MORGAN, M. R. A. Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. **Food Chemistry**, v. 164, p. 23-29, 2014.

SOBOTA, J. F., PINHO, M. G.; OLIVEIRA, V. B. Perfil físico-químico e atividade antioxidante do cálice da espécie *Hibiscus sabdariffa* L. a partir do extrato aquoso e alcoólico obtidos por infusão e decocto. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 10, n. 1, p. 33-46, 2016.

SOUZA, E.L. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. **Revista Higiene alimentar**, v.17, n.113, p.38-42, 2003.

TEIXEIRA, L. N.; STRINGHETA, P.C; OLIVEIRA, F.A. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. **Revista Ceres**, v.4, n.55, p.297- 304, 2008.

TSAI, P. J., McIntosh J, Pearce P, Jordan BR Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract. **Food Research International**, v.35, p.351–356, 2002.

TSAI, P.J. & HUANG, H.P., 2004. Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle. **Food Research International**, n.37, v.4, p.313–318, 2004.

VACCARI, N. F. S.; SOCCOL, M. C. H.; IDE, G. M. Compostos fenólicos em vinhos e seus efeitos antioxidantes na prevenção de doenças. **Revista de Ciências Agroveterinárias**, Lages, v. 8, n. 1, p. 71-83, 2009.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos secundários encontrados em plantas e sua importância**. Pelotas: Embrapa Clima Temperado, 2010. 16 p. – (Embrapa Clima Temperado. Documentos, 316).

WANG, J.; CAO, X.; QI, Y.; FERCHAUD, V.; CHIN, K.L.; TANG, F. High-Performance Thin-layer chromatographic method for screening antioxidant compounds and discrimination of *Hibiscus sabdariffa* L. by principal component analysis. **Journal of Planar Chromatography**, v. 28, p. 274-279, 2015.

W.A. LUVONGA, M.S. NIJORGE, A. MAKOKHA, P.W. NGUNJIRI, Chemical characterization of *Hibiscus sabdariffa* (roselle) calyces and evaluation of its functional potential in the food industry, Proceedings of JKUAT Scientific and Industrial Conference, Kenya, 2010, pp. 631–638.

WOOTTON-BEARD, P. C., MORAN, A., RYAN, L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. **Food Research International**, 44(1), p. 217-224, 2011.

YANG, L., GOU, Y., ZHAO, T., ZHAO, J., LI, F., ZHANG, B., WU, X. Antioxidant capacity of extracts from calyx fruits of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **African Journal of Biotechnology**, 11(17), p. 4063-4068, 2014.

ZHEN, J.; VILLANI, T. S.; GUO, Y.; QI, Y.; CHIN, K.; PAN, M.; HO, C.; SIMON, J. E.; WU, Q. Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdariffa* leaves. **Food Chemistry**, v. 190, p.673-680, 2016.