

QUANTIFICAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS, PODER ANTIOXIDANTE E TEOR DE AÇUCARES EM INFUSÃO E EXTRATO SOLÚVEL DE *Hibiscus sabdariffa* L.



Revista
Desafios

Artigo Original
Original Article
Artículo Original

Quantification of phenolic compounds, antioxidant power and sugar content in infusion and soluble extract of Hibiscus sabdariffa L.

Cuantificación de compuestos fenólicos, potencial antioxidante y contenido de azúcar en infusión y extracto soluble de Hibiscus sabdariffa l.

Denise Rocha Ramos Barbosa^{*1}, Daiara Rakeli Simão Boyarski¹, Thássia Fernandes Santana de Macena¹, Rodolfo Castilho Clemente^{1,2}

¹ Laboratório de Ciências Básicas e de Saúde, Curso de Nutrição, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, Brasil.

² Laboratório de Tecnologia de Alimentos, Curso de Nutrição, Universidade Federal do Tocantins, Palmas, Brasil.

*Correspondência: Laboratório de Ciências Básicas e de Saúde, Universidade Federal do Tocantins, Av. NS 15, 109 Norte, Palmas, Tocantins, Brasil. CEP:77.010-090. e-mail deniserocharamos@yahoo.com.br.

Artigo recebido em 13/10/2019 aprovado em 11/03/2020 publicado em 20/04/2020.

RESUMO

O *Hibiscus sabdariffa* L. é muito apreciado em forma de infusão de suas flores, ou na forma de extrato solúvel comercial. Neste estudo, infusão e extrato solúvel de *H. sabdariffa* foram usados com o objetivo de avaliar a capacidade antioxidante e o teor de compostos fenólicos, bem como o teor de açúcares redutores e não redutores dessas infusões e extratos. O estudo apresentou delineamento casualizado, sendo as amostras selecionadas por conveniência. Foram utilizados métodos espectrofotométricos para a quantificação de compostos fenólicos totais, flavonoides, taninos totais e condensados, antocianinas monoméricas, bem como a quantificação de açúcares redutores e não redutores e avaliação da capacidade antioxidante. Os resultados obtidos podem inferir que as análises tiveram resultados significativos, corroborando com o já descrito em literatura, mostrando que as infusões tiveram resultados superiores para os compostos fenólicos avaliados e capacidade antioxidante e menores teores de açúcares. Contudo, é evidente a ausência de estudos sobre a quantificação de bioativos, assim como açúcares, para extratos solúveis, o que por isso, dificultou o

comparativo de alguns dos dados encontrados nesse estudo. Constatamos também os efeitos benéficos dos compostos fenólicos e capacidade antioxidante do *H. sabdariffa*, sendo que essa planta possui quantidades consideráveis dessas substâncias.

Palavras-chave: capacidade antioxidante, compostos bioativos, hibisco.

ABSTRACT

The Hibiscus sabdariffa L. is very appreciated as an infusion or soluble extracts of their flowers. In this research, infusion and soluble extract of H. sabdariffa were used with the aim of evaluate the antioxidante capacity and the content of phenolic compounds, as well as the content of reducing and non reducing sugars of these infusions and extracts. The study presented a randomized design, being the samples selected for convenience. Spectrophotometric methods were used to perform the quantification of total phenolic compounds, flavonoids, total and condensed tannins, monomeric anthocyanins, as well reducing and non reducing sugars and evaluation of antioxidant capacity. The obtained results show the analysis had significant results, corroborating with described results in literature, showing that the infusions had superior results for the evaluated phenolic compounds and antioxidante activity and fewer sugar content. However, it is evident the absent of researches about quantification of bioactives, as well sugars on soluble extracts. Also were verified the beneficial effects of phenolic compounds and antioxidant capacity of H. sabdariffa, having appreciable content of these compounds on this plant.

Keywords: antioxidant capacity, bioactive compounds, hibiscus.

RESUMEN

El Hibiscus sabdariffa L. eres muy apreciado em la forma de infusión de tus flores, o em la forma del extracto soluble comercial. Em este estudio, la infusión y extracto soluble fueran usados com el objetivo de evaluar la capacidad antioxidante y contenido de fenólicos, bien como contenido de azúcares reductores y no reductores. El estudio se presentó con un diseño aleatorizado, com muestras seleccionadas por conveniencia. Se utilizarn métodos espectrofotométricos para la cuantificación de compuestos fenólicos totales, flavonoides, taninos totales y condensados, antocianinas monoméricas, bien como cuantificación de azúcares reductores y no reductores y evaluación de la capacidad antioxidante. Los resultados obtenidos pueden inferir que las análisis tuvieron resultados significativos, corroborando com lo que ha descrito em la literatura, mostrando que las infusiones tuvieron resultados superiores para los compuestos fenólicos y la capacidad antioxidante y menores contenidos de azúcares. Sin embargo, es evidente la ausencia de estudios sobre la cuantificación de bioactivos, así como azúcares, en extractos solubles, lo que há tornado difícil la comparación de algunos dados obtenidos em este estudio. Encontramos también, los efectos benéficos de los compuestos fenólicos y capacidad antioxidante del H. sabdariffa, siendo que esta planta tiene cantidades considerables de estas substancias.

Descriptores: capacidad antioxidante, compuestos fenólicos, hibisco.

INTRODUÇÃO

Hibiscus L. é um gênero de variadas ervas anuais ou perenes, catalogadas em cerca de 300 espécies, inseridas na família Malvaceae (ANJOS et al., 2017).

É uma importante planta medicinal, originária da Índia, do Sudão e da Malásia, sendo posteriormente levado para a África, Sudeste da Ásia, América Central e América do Sul (RAMOS et al., 2011; FREITAS et al., 2013; UYEDA et al., 2016).

No Brasil, o hibisco chegou por meio do tráfico de escravos africanos, no século XVII, e passou a ser cultivado em todas as regiões brasileiras, especialmente na região sudeste (RAMOS et al., 2011).

Nacionalmente a espécie mais cultivada é a *H. sabdariffa* L., um arbusto anual e semi-lenhoso com cerca de 2 a 3 metros de altura, sendo conhecida popularmente como azedinha, azeda-da-guiné, caruru-azedo, caruru-da-guiné, chá-da-jamaica, pampolha, ampulha, papoula, papoula-de-duas-cores, quiabeiro-azedo, quiabo-azedo, quiabo-de-angola, quiabo-róseo, quiabo-roxo, rosélia e vinagreira (RAMOS et al., 2011; FREITAS et al., 2013; UYEDA et al., 2016).

Essa espécie apresenta folhas lobadas, com flores de coloração branca ou amarela com o centro escuro e sépalas carnosas e vermelhas rodeadas por uma camada de brácteas ou epicálice (ANJOS et al., 2017).

Essa planta é rica em cálcio, magnésio, ferro, vitaminas A, B1 e C, além de fitoquímicos, antocianinas, ácido tartárico, málico, cítrico e hibístico, fitosteróis como o sitosterol, campesterol, ergosterol, estigmasterol e fibras alimentares (RAMOS et al., 2011, SOBOTA et al., 2016).

Na medicina popular, suas diferentes partes apresentam várias funcionalidades, sendo utilizada como antiespasmódico, anti-inflamatório, redutor da hipertensão, antioxidante natural, afrodisíaco, diurético, laxante suave e auxiliar nas dietas de emagrecimento. Na alimentação humana é usada em preparação de saladas cruas, ingrediente para o preparo de cozidos (sopas, feijão e arroz), sobremesas e produtos de confeitaria como geleias e doces, vinagres, pickles e de bebidas como vinhos, sucos e chás (MOURA et al., 2016, ANJOS et al., 2017).

Conforme preconizado pela Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária-ANVISA, o chá do hibisco pode ser feito por meio do infuso, feito com uma ou mais partes dessa espécie, podendo ser inteira, fragmentada ou moída, com ou sem fermentação, tostada ou não, ou com extrato solúvel, que é designado como um método resultante da desidratação do extrato aquoso da espécie vegetal, obtidos por métodos físicos, utilizando água como único agente extrator, podendo ser adicionados de aroma (BRASIL, 2005).

O chá de hibisco, obtido de partes da planta, precisamente seu cálice seco, apresenta diversos benefícios para a saúde, como por exemplo, estimular o metabolismo, ação digestiva e diurética, redução das taxas de lipídios e glicose totais no sangue e no combate ao estresse (MONROY-ORTIZ e CASTILLO-ESPANA, 2007).

Devido às propriedades terapêuticas do hibisco, o consumo particularmente do chá desta planta tem crescido no Brasil (NEHRING et al., 2015). Contudo, em decorrência desse crescimento, torna-se necessário a avaliação da

qualidade dos chás de *H. sabdariffa* comercializadas no Brasil e mesmo do teor das propriedades medicinais desse chá nas duas formas mais comum de consumo no país, a erva *in natura* / infuso e em pó (extrato solúvel). Neste estudo, chás em formas de infusão e extrato solúvel de *H. sabdariffa* de três marcas revendidas no município de Palmas, Estado do Tocantins, Brasil, foram avaliadas quanto à sua capacidade antioxidante, teores de açúcares (reduzidos e não reduzidos), teores de fenóis, flavonoides, taninos (totais e condensados) e antocianinas monoméricas.

MATERIAIS E MÉTODOS

Obtenção das amostras

Três marcas diferentes de cálice seco, bem como de extratos solúveis em pó de *H. sabdariffa* foram adquiridas no comércio local de Palmas/TO. As diferentes marcas foram identificadas como infuso 1, 2 e 3 e extrato 1, 2 e 3 respectivamente.

Preparo das infusões

Para a preparação dos chás em infusão, foram pesados em balança de precisão, 1,25 g de cada uma das três marcas diferentes de cálice seco da planta e após pesadas, colocadas em béqueres de vidro e sendo, em seguida, vertido água filtrada aquecida (~ 90°C) até completar 250 ml. Cada recipiente permaneceu em infusão por 15 minutos, obtendo ao final uma concentração de 0,013 g/mL do chá. Após o preparo, os chás foram transferidos e armazenados em garrafas plásticas à temperatura ambiente (27°C ± 2) até a realização dos diferentes ensaios.

Preparo dos extratos em pó

Para a preparação dos chás com extratos, foram pesados em balança de precisão, 1,25 g de

cada uma das três marcas diferentes de pó de hibisco e após pesadas, colocadas em béqueres de vidro e sendo, em seguida, vertido água filtrada à temperatura ambiente até completar 250 ml e agitadas até sua completa dissolução. Após, cada extrato foi filtrado em papel filtro comercial, para a eliminação de possíveis partículas.

Quantificação de fenólicos totais

Para a quantificação de fenólicos totais, foi utilizada a metodologia descrita por Bonoli et al. (2004), onde alíquotas de 0,1 mL de amostra foi diluída em 0,5 mL de Folin-Ciocalteu 2 N (Sigma Aldrich) e, posteriormente acrescentados 6 mL de água destilada, sendo agitados em vortex por 1 minuto. Após, foi adicionado 2 mL de solução de carbonato de sódio a 15%, sendo novamente agitados por 30 segundos. Após repouso ao abrigo da luz por 2 horas, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Thermo Scientific™ GENESYS™) a 750 nm, usando como “branco” todos os reagentes, exceto o extrato.

O teor de fenólicos totais foi determinado por interpolação da absorbância das amostras comparada a uma curva de calibração feita com ácido gálico nas concentrações de 10 a 1000 g/mL e expressos como mg equivalentes de ácido gálico (EAG) por mL de amostra.

Quantificação de taninos totais

Para a quantificação dos taninos totais, foi utilizada a metodologia de Amorim et al. (2008) com adaptações. Em tubos contendo 1 mL das amostras foi adicionado 100 mg de caseína e 1 mL de água destilada, sendo agitados por 1 minuto em vortex e posterior deixado em repouso ao abrigo da luz por 15 minutos para a complexação de tanino-proteína. Após o repouso, foram agitados

novamente por 30 segundos, sendo, em seguida, centrifugados a 5000 rpm por 4 minutos. Foram transferidos 0,2 mL dos sobrenadantes em tubos (150 mL) e repetido o protocolo de fenóis totais para a determinação de fenóis simples.

O teor de taninos totais foi calculado por meio da diferença entre os fenóis totais e os fenóis simples, uma vez que os taninos foram complexados e precipitados com a caseína.

Quantificação de taninos condensados

Para a quantificação de taninos condensados, foi executado o método do butanol-HCl, conforme Schofield (2001) com modificações. Tubos contendo 0,3 mL das amostras foram adicionados de 1,8 de butanol-HCL 5%, agitados em vortex e colocados em banho-maria a 100° C por 70 minutos. Feito isso, foram resfriados em banho frio por 5 minutos para interrupção da reação. As amostras foram lidas em espectrofotômetro (Thermo Scientific™ GENESYS™) a 550 nm, sendo o branco de cada amostra os mesmos componentes, mas sem serem submetidos ao banho-maria. O teor de taninos condensados foi determinado por interpolação da absorbância das amostras em curva de calibração feita com tanino purificado de *Pinus pinaster* (pinheiro-bravo) nas concentrações de 10 a 500 g/mL e expressos como g de tanino/mL das amostras.

Quantificação de flavonoides

Para a quantificação dos flavonoides, foi utilizada a metodologia de Dewanto et al. (2002), onde tubos contendo 0,25 mL das amostras foi adicionado de 1,25 mL de água destilada e agitados com 75 µL de solução aquosa de nitrito de sódio 5% e deixados em repouso por 6 min. Feito isso,

foi adicionado 150 µL de solução aquosa de cloreto de alumínio 10%, agitados e deixados em repouso por mais 5 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,5 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 1M e agitados novamente. Após, foram lidas as absorbâncias em espectrofotômetro a 510 nm, sendo o teor de flavonoides determinado por interpolação da absorbância das amostras em uma curva de calibração feita com quercetina nas concentrações de 0,1 a 5 mg/mL e expressos como mg de flavonoides por mL de amostra.

Quantificação de antocianinas monomérica

A quantificação de antocianinas monoméricas foi realizada pelo método do pH diferencial, conforme Giusti e Wrosltad (2001). Alíquotas de 0,6 mL das amostras foram diluídas em 3,4 mL de tampão de cloreto de potássio pH 1,0 (0,025 M) e em tampão acetato de sódio pH 4,5 (0,4 M). Após repouso por 15 minutos, as amostras foram lidas em espectrofotômetro (Thermo Scientific™ GENESYS™) nas absorbâncias de 510 nm e 700 nm, respectivamente. Feito isso, a absorbância diferencial foi calculada por meio da equação:

$$A = (a_{510} - a_{700})_{\text{pH}1,0} - (a_{510} - a_{700})_{\text{pH}4,5}$$

Onde a 510 foi a absorbância obtida a 510 nm e a700 a absorbância a 700 nm.

Obtida a absorbância diferencial, foi calculada a seguinte equação, expressando os resultados em mg de antocianinas monoméricas por mL de amostra:

$$AM = A \times PM \times FD \times 100 / \epsilon \times L$$

Sendo AM – antocianinas monoméricas, PM – peso molecular da cianidina-3-glicosídeo (449,2), FD – fator de diluição (6,67), ϵ – absorvidade

molar da cianidina-3-glicosídeo (26900) e L – caminho óptico, que é o tamanho da cubeta (1,0 cm).

Teste de poder redutor do íon férrico

Para o teste de poder redutor do íon férrico, foi utilizada a metodologia validada e otimizada por Berker et al. (2010). Em tubos contendo 1 mL das amostras (1 mL de água destilada para o branco) foi adicionado 6,3 mL de água, 0,2 mL de ácido clorídrico 1 M, 1,5 mL de ferricianeto de potássio 1% e 0,5 mL de dodecilsulfato de sódio 1%. Após agitação, foi adicionado 0,5 mL de cloreto férrico 0,2% e agitados novamente. Após repouso ao abrigo da luz por 30 minutos, foram lidas as absorvâncias a 750 nm em espectrofotômetro (Thermo Scientific™ GENESYS™). Os resultados foram expressos em percentual de redução do ferro em comparação com os padrões quercetina e ácido ascórbico.

Sequestro de radicais livres

Para o sequestro de radicais livres foi utilizado a metodologia com uso do radical DPPH adaptada por Pereira *et al.* (2012) com modificações. Foi preparado 250 mL de solução estoque de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) em etanol absoluto, na concentração de 40 µg/mL, mantida sob refrigeração e protegida da luz.

Foi realizada a construção de curva de calibração nas concentrações de 40, 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 µg/mL, a partir dos valores da absorvância a 515 nm de todas as soluções, sendo usado como branco o etanol.

As diluições das amostras e dos padrões nas concentrações de 4, 8, 16, 31, 63, 125, 250, 500 e 1000 µg/mL foram obtidas e 0,3 mL de cada diluição foi reagida com 2,7 mL de solução estoque

de DPPH. Para o branco foi usado etanol no lugar do DPPH, sendo feito 1 tubo “branco” para cada concentração. As leituras das absorvâncias das misturas reacionais foram realizadas a 515 nm após 1 hora. A partir da equação da curva de calibração de DPPH e dos valores de absorvância no tempo de 1 hora, para cada concentração testada, foram determinados os valores de DPPH₆₀, que é a concentração remanescente de DPPH no meio reacional após 60 minutos. Feito isso foi calculado o percentual de DPPH Remanescente (%DPPHRem), conforme a Equação:

$$\%DPPHREM = [DPPH]_{T=t} / [DPPH]_{T=0} \times 100$$

Onde [DPPH]_{T=t} corresponde à concentração de DPPH após a reação com o extrato e [DPPH]_{T=0} é a concentração inicial de DPPH, ou seja, 40 mg/mL. As amostras foram comparadas aos padrões quercetina e BHT (di-terc-butil-hidroxitolueno).

A concentração eficiente, quantidade amostra de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE₅₀), foi determinada a partir de uma curva analítica, obtida plotando-se na abscissa as concentrações da amostra (µg/mL) ou do controle positivo e na ordenada, a porcentagem de DPPH remanescente (% DPPHREM).

Açúcares redutores e não redutores

Para a análise de açúcares redutores e não redutores, foi conduzida a proposta de Maldonade et al. (2013) e Vasconcelos et al. (2013) usando o reagente ácido 3-5-dinitrossalicílico (DNS). Para a quantificação de açúcares redutores (AR) foram usadas alíquotas de 0,5 mL dos extratos (0,5 mL de

água destilada como branco) e agitados 0,5 mL do reagente, sendo colocados em banho-maria a 100°C por 15 minutos e, posteriormente, submetidos a banho de gelo por 5 minutos para interrupção da reação. As absorbâncias foram lidas a 540 nm e interpoladas em curva de calibração feita com solução de glicose anidra a 2 mg/mL e os resultados expressos em mg de AR/mL de extrato.

Para os açúcares não redutores (ANR), alíquotas de 2 mL das amostras foram adicionadas de 2 mL de HCl 2M e submetidas a banho-maria a 100°C por 10 minutos para hidrólise dos açúcares, sendo posteriormente submetidas a banho de gelo por 5 minutos e agitados com 2 mL de NaOH 2M para neutralização do ácido. Em seguida, alíquotas de 0,5 mL destas misturas foram submetidas ao mesmo tratamento dos AR. As absorbâncias foram plotadas na mesma curva de calibração anteriormente utilizada e os resultados foram obtidos através da equação $ANR = A * 3 - AR$ sendo A o resultado obtido pela interpolação da absorbância da amostra na curva, multiplicados por 3 devido ao processo de diluição necessária ao processo de hidrólise das amostras e, posteriormente subtraídos pelo teor de açúcares redutores.

Análises Estatísticas

Todas as análises foram realizadas em triplicatas. Os dados obtidos foram agrupados, calculados e analisados por meio de estatística descritiva, e para comparação entre médias foi utilizada Análise de Variância – ANOVA, de dois

fatores, seguido de teste de Tukey, com nível de significância de 5%. Os cálculos das curvas de calibração e as análises estatísticas foram feitas através do programa Microsoft Office Excel® 2016 e o programa estatístico Graph Pad Prism 7.0

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com relação à quantidade de fenólicos totais, as amostras dos infusos apresentaram diferenças significativas ($p < 0.001$) em comparação com os extratos solúveis (Tabela 1).

As amostras das três infusões apresentaram valores semelhantes entre si de valores totais de fenóis, variando de 122,4 µg EAG/mL (infuso 3) a 141,6 µg EAG/mL (infuso 1), enquanto que nos extratos solúveis houve diferenças significativas ($p < 0.001$) entre as três amostras, sendo que o extrato 3 (81,3 µg EAG/mL), foi a que apresentou maior teor de compostos fenólicos totais (Tabela 1).

Com relação à quantificação de flavonoides, as três amostras de infusões também se destacaram, apresentando maiores quantidades e diferenças significativas ($p < 0.001$) em relação aos extratos solúveis, tendo a amostra 3 do infuso o maior valor de flavonoides, porém sem diferenças significativas ($0,26 \pm 0,0$ mg/mL) em relação às amostras 1 e 2 dos infusos. No entanto, as amostras dos extratos solúveis apresentaram diferenças significativas ($p < 0.001$), sendo o extrato solúvel 3 (0,16 mg/mL) com valor maior em relação às demais amostras de extratos (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação de fenólicos totais e flavonóides entre infusões e extrato solúvel de *H. sabdariffa*.

Infusões	Fenois Totais ($\mu\text{g EAG/mL}$)	Flavonoides (mg/mL)
	Média \pm DP *	
Infuso 1	141,6 \pm 13 ^a	0,19 \pm 0,0 ^a
Infuso 2	132,8 \pm 31 ^a	0,17 \pm 0,0 ^a
Infuso 3	122,4 \pm 26,5 ^a	0,26 \pm 0,0 ^a
Extratos solúveis	Fenois Totais ($\mu\text{g EAG/mL}$)	Flavonoides (mg/mL)
	Média \pm DP*	
Extrato 1	12,9 \pm 0,3 ^c	0,03 \pm 0,0 ^c
Extrato 2	14,1 \pm 0,5 ^c	0,07 \pm 0,0 ^c
Extrato 3	81,1 \pm 13,9 ^b	0,16 \pm 00 ^b

Fonte: Autores.

Legenda: (*) desvio padrão.

Nota: Colunas de médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em um estudo realizado por Guindani et al. (2014) o total de compostos fenólicos em infusão de *H. sabdariffa* com água acidificada (pH 1,5) foi de 3.466,30 \pm 232,56 mg/L, sendo um teor superior ao encontrado no presente estudo. Entretanto, esses autores utilizaram uma concentração maior de matéria seca de hibisco (1:5 p/v) em comparação ao utilizado nesse estudo. Além disso, o fato de terem utilizado água acidificada também pode ter contribuído para o encontro de um valor maior de compostos fenólicos.

No estudo de Carvalho et al. (2012) foi encontrado, em extratos aquosos na proporção de 1:10 p/v, teores de 12,10 \pm 0,53 $\mu\text{g/mL}$ de fenois totais, valor menor do que o encontrado no presente estudo para as três amostras de infusões e duas amostras de extrato (2 e 3), contudo similar ao encontrado na amostra 1 desse estudo.

Humadi et al. (2008) encontraram em seu estudo usando 100 g de matéria seca de extrato

aquoso de *H. sabdariffa*, quantidades de 0,024 g% \pm 0,034 de flavonoides, valor maior do que o encontrado nas amostras 1 e 2 dos infusos e das três amostras de extratos, contudo similar (0,26 \pm 0,0 mg/mL) ao valor encontrado na amostra 3 do infuso de hibisco no presente estudo.

As três amostras das infusões não diferiram estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$) para os valores de taninos totais. Porém em relação aos extratos solúveis, a amostra 3 (21,0 $\mu\text{g/mL}$) apresentou teor maior em comparação aos extratos solúveis 1 e 2 (4,2 e 7,2 $\mu\text{g/mL}$), respectivamente (Tabela 2).

Também para os taninos condensados, as infusões não apresentaram diferenças estatísticas entre si. A única amostra dos extratos solúveis a apresentar concentração de taninos condensados, a amostra 3 (22,4 \pm 2,3 $\mu\text{g/mL}$), também foi a que apresentou maior valor entre todas as amostras analisadas (Tabela 2).

Para as antocianinas monoméricas, as infusões diferiram estatisticamente entre si. Nos extratos solúveis, a amostra 2 não apresentou concentração de antocianinas monoméricas, com a amostra 3 ($4,0 \pm 0,1$ mg/100 mL) apresentando

valor maior que a amostra 1 ($0,3 \pm 0,1$ mg/100 mL) (Tabela 2).

Tabela 2. Quantificação de taninos totais, taninos condensados e antocianinas entre infusões e extrato solúvel de *H. sabdariffa*.

Infusões	Taninos Totais	Taninos Condensados ($\mu\text{g/mL}$)	Antocianinas
	($\mu\text{g/mL}$)		(mg/100 mL)
	Média	Média \pm DP*	Média \pm DP*
Infuso 1	62,3 ^a	16,7 \pm 9,9 ^a	3,6 \pm 0,1 ^c
Infuso 2	56,0 ^a	8,3 \pm 2,1 ^a	2,4 \pm 0,0 ^d
Infuso 3	31,6 ^a	21,2 \pm 3,9 ^a	5,0 \pm 0,0 ^a
Extratos solúveis	Taninos Totais	Taninos Condensados ($\mu\text{g/mL}$)	Antocianinas
	($\mu\text{g/mL}$)		(mg/100 mL)
	Média	Média \pm DP*	Média \pm DP*
Extrato 1	4,2 ^b	0,0 \pm 0,0 ^{ba}	0,3 \pm 0,0 ^e
Extrato 2	7,2 ^b	0,0 \pm 0,0 ^{ba}	0,0 \pm 0,0 ^e
Extrato 3	21,0 ^c	22,4 \pm 2,3 ^{ca}	4,0 \pm 0,1 ^b

Fonte: Autores.

Legenda: (*) desvio padrão.

Nota: Colunas de médias com letras iguais não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

No estudo de Guindani et al. (2014), onde os autores determinaram os teores de antocianina em plantas de hibisco pelo pH diferencial utilizando um solvente aquoso acidificado (HCl) em pH 1,5, encontraram um valor de $666,29 \pm 90,69$ mg/L, valor este bem superior ao encontrado no presente estudo. Contudo, assim como os mesmos autores encontraram valores superiores de compostos fenólicos totais em comparação também a esse estudo, o fato de terem encontrado valor superior de antocianina encontra-se de certa forma influenciado pelo solvente usado no estudo, pois sabe-se que compostos fenólicos como as

antocianinas, apresentam maior afinidade com ambientes acidificados.

Em outro estudo visando determinação dos teores de antocianina em plantas de hibisco (MACIEL et al., 2012), porém usando como solvente álcool etílico de cereais a 96 °GL, os autores também encontraram valor maior ($85,9$ mg.100g⁻¹), desse composto em comparação ao presente estudo, porém inferior ao encontrado por Guindani et al. (2014). Sendo assim, também podemos constatar que o solvente é algo que influencia grandemente a quantificação de

compostos orgânicos como a antocianina (PEREIRA et al., 2016).

Com base nos nossos dados, podemos constatar que chás feitos por meio de infusão foram as que apresentaram maiores quantidades dos compostos fenólicos (fenóis totais, flavonoides, taninos totais e condensados e antocianinas), o que demonstra que usar partes da planta, precisamente seu cálice seco, para hibisco de certa forma preserva as propriedades benéficas e medicinais dessa erva.

A alta perspectiva para produtos nutracêuticos do hibisco se deve majoritariamente à presença dos metabólitos secundários como os compostos fenólicos em suas folhas, sementes e flores (NEHRING et al., 2015). Compostos fenólicos são uma classe de compostos químicos que consistem em um grupo hidroxila ligado diretamente a um grupo hidrocarboneto aromático, destacando por suas propriedades de quelante de metais, inibir a enzima lipoxigenase e sequestrar radicais livres (MORAIS e NASCIMENTO, 2016).

Devido *H. sabdariffa* apresentar alto teor de antioxidante, que são substâncias que retardam ou impedem o estresse oxidativo, principalmente provocado por radicais livres, uma das causas de determinadas patologias degenerativas, o seu consumo tem aumentado bastante no Brasil (PRENESTI et al., 2007).

Além de conter antioxidantes, essa espécie também apresenta compostos como quercetina, ácido ascórbico açúcares redutores, como a glicose e a frutose e não redutores como a maltodextrina e

a sacarose. Assim, tomando como base que para que um produto seja amplamente comercializado e aceito pela população, a determinação da concentração de seus compostos como, por exemplo, açúcares é um indicador imprescindível para a determinação de sua qualidade. A OMS recomenda uma baixa ingestão de açúcares livres ao longo de toda a vida (OMS, 2015)

Açúcares redutores (AR) são monossacarídeos, como a frutose e a glicose, e alguns dissacarídeos, como a maltose e a lactose. As suas funções cetônicas e aldeídicas livres possibilitam a redução de íons catiônicos, como o Cobre e o Ferro. Já os açúcares não-redutores (ANR) precisam sofrer hidrólise da ligação glicosídica para oxidar. E geralmente precisam de ácidos fortes para hidrolisar ou o uso de enzimas (como a invertase, no caso da sacarose) (DEMIATE et al., 2002).

Neste estudo, os extratos solúveis 1 e 2, foram as amostras que apresentaram maiores valores de açúcares redutores e não redutores em comparação com as três amostras dos chás em infusão (Tabela 3).

Os maiores valores de açúcares nos chás dos extratos solúveis 1 e 2 se deve à presença de aditivos, corantes ou até mesmo de açúcares não redutores, como a maltodextrina.

Tabela 3. Conteúdo de açúcares redutores e não redutores em infusões e extrato solúvel de *H. sabdariffa*.

Infusões	Açúcares	
	redutores (mg/mL)	não redutores (mg/mL)
Infuso 1	0,5 ± 0,0 ^{ed}	0,2 ± 0,0 ^d
Infuso 2	0,5 ± 0,0 ^e	0,17 ± 0,0 ^{ed}
Infuso 3	0,6 ± 0,0 ^c	0,14 ± 0,0 ^{fd}

Extrato Solúvel	Açúcares	
	redutores (mg/mL)	não redutores (mg/mL)
Extrato 1	2,2 ± 0,0 ^a	1,5 ± 0,0 ^b
Extrato 2	1,2 ± 0,0 ^b	2,0 ± 0,1 ^a
Extrato 3	0,5 ± 0,0 ^{dc}	0,4 ± 0,1 ^c

Fonte: Autor.

Legenda: (*) Desvio padrão.

Nota: Médias expressas em miligrama de açúcar redutor ou açúcar não redutor por mL do extrato (mg AR ou ANR/ mL de extrato).

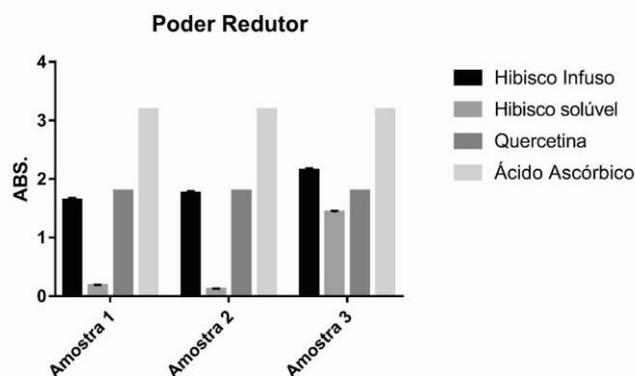
Com relação ao poder redutor entre amostras de infusão e extrato solúvel de *H. sabdariffa*, comparados aos padrões quercetina e ácido ascórbico, nota-se que as amostras de chás em infusão apresentaram maiores valores de poder redutor em comparação com as amostras dos extratos (Figura 1).

O encontro de maior valor redutor em amostras de infusões em comparação com as amostras de extratos solúveis se deve a presença de compostos capazes de reduzir o íon férrico em íon ferroso do meio reacional, como os compostos fenólicos, com isto mostrando o potencial de redução também de radicais livres (BERKER et al., 2010).

A amostra 3 de infusão foi a que apresentou maior poder redutor dentre todas as amostras analisadas, tanto para infusos, quanto para extratos, sendo maior inclusive que o padrão quercetina e com 66,95% de atividade redutora, quando comparado ao padrão com ácido ascórbico (Figura 1).

Os padrões quercetina e ácido ascórbico são usados por serem antioxidantes naturais bem conhecidos um sendo sintético e outro natural, nessa ordem respectivamente.

Figura 1: Poder redutor entre amostras de infusão e extrato solúvel de *H. sabdariffa*, comparados aos padrões quercetina e ácido ascórbico.

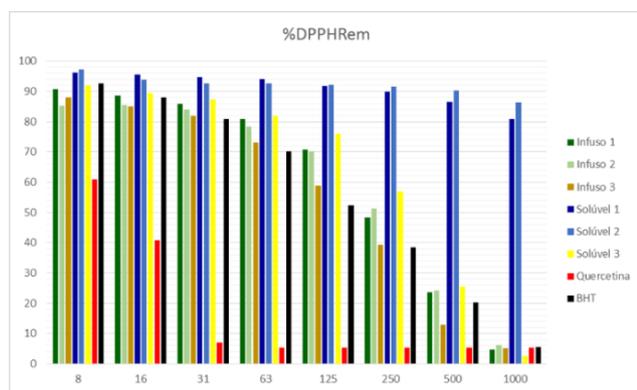


Quanto a atividade antioxidante de *H. sabdariffa* em comparação aos padrões quercetina e BHT, os extratos solúveis apresentaram atividade

antioxidante significativamente inferior ($p < 0.001$) ao padrão quercetina.

Nas atividades antioxidantes de infusões e extratos solúveis de *H. sabdariffa*, em comparação com os padrões quercetina e BHT, as amostras, em um contexto geral, tiveram atividade antioxidante significativamente inferior ao padrão quercetina. Porém, ao analisar as diferentes concentrações usadas no método, vemos que a atividade antioxidante aumenta para todas as amostras de infusões e extrato solúvel 3, sendo que, a partir da concentração de 250 $\mu\text{g/mL}$, estas amostras apresentaram semelhanças com o padrão BHT e, nas concentrações de 500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$, apresentaram atividade antioxidante semelhante aos padrões quercetina e BHT. Porém, os extratos solúveis 1 e 2, mesmo nas elevadas concentrações, não obtiveram atividade antioxidante (Figura 2).

Figura 2. Atividade antioxidante de amostras de infusão e extrato solúvel em comparação com os padrões quercetina e BHT de *H. sabdariffa* L.



Fonte: Autor.

Legenda: Nas ordenada estão a % de concentração remanescente de DPPH após descanso de 1 h ao abrigo da luz e nas abscissas estão às diluições das amostras ($\mu\text{g/mL}$).

Com isto, pode-se observar que, os infusos e o extrato solúvel 03, nas concentrações iniciais do estudo (5 g/L) obteve atividade de sequestro de radicais livres bastante semelhante aos padrões

usados quercetina, um flavonoide naturalmente presente em plantas, e o BHT, um antioxidante sintético muito usado na indústria de alimentos.

Tabela 4. Valores de CE_{50} de infusões e extratos solúveis de *H. sabdariffa*.

Infusões	Concentrações (mg/mL)
Infuso 1	254,58
Infuso 2	259,89
Infuso 3	177,12
Extratos Solúveis	Concentrações (mg/mL)
Solúvel 1	-
Solúvel 2	-
Solúvel 3	303,14

Fonte: Autor.

No estudo de Sobota et al. (2016), o valor de CE_{50} encontrado foi de $200,2 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1} \pm 0,1$ valor menor que apresentado em nosso trabalho, com exceção da amostra 3 do infuso, mostrando que o infuso 03 apresentou maior atividade de sequestro de radicais livres.

CONCLUSÃO

Ressaltamos que devido às quantidades maiores de matérias secas e mesmo os diferentes solventes utilizados nos estudos de quantificação de compostos orgânicos em chás de hibiscos, não permitiu um melhor comparativo com os resultados encontrados no presente estudo. Neste estudo, usamos um valor total de 5 g de matéria seca para 250 mL de água para se aproximar da quantidade usada em casa pelos consumidores brasileiros desse chá. Sendo assim, acreditamos que a padronização também da metodologia, facilitaria e

mesmo ajudaria em outros estudos com esse enfoque.

Constatamos também os efeitos benéficos dos compostos fenólicos e atividades antioxidantes do *H. sabdariffa*, sendo que essa planta possui quantidades consideráveis dessas substâncias.

O extrato infuso apresentou quantidade significativamente maior de fenóis totais, flavonoides em comparação ao extrato solúvel. Esse comportamento foi o mesmo para os taninos totais e condensados. A infusão obteve maior poder redutor e capacidade de redução do radical livre. O extrato solúvel teve destaque com maior presença de açúcares.

AGRADECIMENTO

Agradecemos ao Laboratório de Ciências Básicas e da Saúde (LACIBS) e Laboratório de Tecnologia de Alimentos do curso de Nutrição, ambos da UFT, pelo espaço cedido e materiais para esta pesquisa.

Todos os autores declararam não haver qualquer potencial conflito de interesses referente a este artigo.

REFERÊNCIAS

AL-HASHIMI, A. G. (2012). Antioxidant and antibacterial activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extracts. *African Journal of Food Science*, 6(21), p. 506-511. ISSN 1996-0794.

ANJOS, J. C., MUNHOS, M. P., SILVA, V. N., TIRAPELI, K. G., PEREIRA, A. A. F., NAKAMUNE, A. C. M, S. Estudo *in vitro* da atividade antioxidante de *Hibiscus Sabdariffa* L. *Revista Saúde UniToledo*, 1(1), p. 20-30, 2017

AMORIM, E. L. C., NASCIMENTO, J. E., MONTEIRO, J. M., PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S., ARAÚJO, T., ALBUQUERQUE, U. P. A Simple and accurate procedure for the determination of Tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystems and Communities**, 2 (Special Issue 1), 88-94, 2008.

BERKER KI, GÜÇLÜ K, TOR I, DEMIRATA B, APAK R. Total Antioxidant Capacity Assay Using Optimized Ferricyanide/Prussian Blue Method. **Food Analytical Methods**, 3:154–168, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada n. 277, de 22 de setembro de 2005. Aprova o regulamento técnico para café, cevada, chá, erva-mate e produtos solúveis, constantes no anexo desta Portaria. Diário Oficial [da] União da **República Federativa do Brasil**, Brasília, DF, 23 set. 2005. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2005/res0277_22_09_2005.html>. Acesso em: 11 abr. 2019.

BONOLI, M., VERARDO, V., MARCONI, E., CABONI, M. F. (2004). Antioxidant phenols in barley (*Hordeum vulgare* L.) flour: comparative spectrophotometric study among extraction methods of free and bound phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 52(16), p. 5195-5200. [10.1021/jf040075c](https://doi.org/10.1021/jf040075c).

CARVALHO, M. L., SILVA, B. R., SILVA, M. M., VALE, K. A. Estudo comparativo entre a quantidade de fenólicos totais presentes em folhas

e cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. In: VII **CONEEPI – CONGRESSO NORTE NORDESTE DE PESQUISA E INOVAÇÃO**, 2012, Palmas. Anais eletrônicos...Palmas, 2012. Disponível em: <file:///D:/Downloads/3748-14640-1-PB.pdf>. Acesso em: 10 abr 2019.

DEMIATE, I. M.; WOSIACKI, G.; CZELUSNIAK, C.; NOGUEIRA, A. Determinação de Açúcares Redutores e Totais em Alimentos. Comparação entre Método Colorimétrico e Titulométrico. Publicatio UEPG – **Exact and Soil Sciences, Agrarian Sciences and Engineering**, v. 8, n. 1, p. 65-78, 2002. Disponível em: <http://www.revistas2.uepg.br/index.php/exatas/article/view/772/677> >.

DEWANTO, V., WU, X., ADOM, K., LIU, R. H. J. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, 50(10), p. 3.010-3.014, 2002.

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**, 20(3), 65-72, 2013. <http://dx.doi.org/10.18764/2178-2229.v20n3p65-72>.

Giusti, M. M., Wrolstad, R. E. Anthocyanins: characterization and measurement with uv-visible spectroscopy. In: Wrolstad, R. E. Current protocols in food analytical chemistry. New York: John **Wiley & Sons**, 2001. Unit. F1.2.1- 13.

GUINDANI, M., TONET, F., KUHN, F., DAL MAGRO, J., DALCANTON, F., FIORI, A. A., MELLO, M. M. Estudo do processo de extração dos compostos fenólicos e antocianinas totais do *Hibiscus sabdariffa*. In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA, 1(2), Florianópolis**. Anais eletrônicos...São Paulo: Blucher, 2015. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br.s3-sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/1245-20276-155624.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2019.

NEHRING, P., SERAGLIO, S. K. T., GONZAGA, L. V., FETT, R., COSTA, A. C. O. Influência dos diferentes solventes na avaliação da capacidade antioxidante in vitro de frutos e sementes de pitaiá (*Hylocereus polyrhizus*). **Revista Congresso Sul Brasileiro de Engenharia de Alimentos**, 2(1), p. 1-7, 2016.

MACIEL, M. J. Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante em alimentos. 2011. 61f. Tese (dissertação em tecnologia de alimentos) – **Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Universidade federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.

MALDONADE, I. R., CARVALHO, P. G. B., FERREIRA, N. A. (2013). Protocolo para Determinação de Açúcares totais pelo Método de DNS. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, Brasília, 2013. Disponível em: <http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/81814/1/cot-86.pdf> >

MOURA, S. C. S. R., HUBINGER, M. D., ALVIM, D., GERMER, S. P. M., SOUZA, E. C. G., BERLING, C. L. Caracterização e quantificação de compostos bioativos do hibisco (*Hibiscus Sabdariffa* L.). In/ XXV CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS: ALIMENTAÇÃO: A ARVORE QUE SUSTENTA A VIDA, Gramado/RS. Anais eletrônicos...Gramado: FAURGS, 2016. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/sbctars-eventos/xxvcbcta/anais/files/65.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2019.

MONROY-ORTIZ, C., CASTILLO-ESPANA, P. Plantas medicinales utilizadas en el **Estado de Morelos**. 2nd ed. México: Publisher CCNABIO, 405 p, 2007.

OMS - Organização Mundial da Saúde. Diretriz: Ingestão de açúcares por adultos e crianças. 2015 [acesso em 05 out 2019]. Disponível: <https://www.paho.org> ›

PEREIRA, R. J., NASCIMENTO, G. N. L. Compostos bioativos vegetais. Org: Pereira, R. J., Nascimento, G. N. L. Palmas/TO: **EDUFT**, 97 p, 2016.

PEREIRA, M. C., STEFFENS, R. S., JABLONSKI, A., HERTZ, P. F., RIOS, A. O., VIZZOTTO, M., FLÔRES, S. H. Characterization and antioxidant potential of Brazilian fruits from the Myrtaceae family. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 60(12), p, 2012. 3061-3067. 10.1021/jf205263f.

PRENESTI, E.; BERTO, S.; DANIELE, P. G.; TOSO, S. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. **Food Chemistry**, n.2, p.433-438, 2007.

RAMOS, D. D., VIEIRA, M. C., FORMAGIO, A. S. N., CARDOSO, C. A. L., RAMOS, D. D., CARNEVALI, T. O. (2011). Atividade antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica. **Ciência Rural**, 41(8), 1331-1336, 2011. ISSN 0103-8478.

SALAZAR-GONZALEZ C., VERGARA-BALDERAS, F.T., ORTEGA-REGULES, A. E., GUERRERO-BELTRAN, J. A. Antioxidant properties and color of *Hibiscus sabdariffa* extracts. **Ciencia Investigacion Agraria**, 39(1): 79-90, 2012. <http://dx.doi.org/10.4067/S0718-16202012000100006>.

SOBOTA, J. F., PINHO, 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 decocção. **Revista Fitos Eletrônica**, 10(1), p. 33-46, 2016. <http://dx.doi.org/10.5935/2446-4775.20160004>.

SCHOFIELD, P., MBUGUA, D. M., PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, 91(1-2), 21-40, 2001. [http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0).

VASCONCELOS, N. M., PINTO, G. A. S., ARAGÃO, F. A. S. Determinação de Açúcares Redutores pelo Ácido 3,5-Dinitrosalicílico:

Histórico do Desenvolvimento do Método e Estabelecimento de um Protocolo para o Laboratório de Bioprocessos. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, Fortaleza, 2013.

Disponível em:

<http://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/103342/1/BPD13017.pdf>.

UYEDA, M., FERREIRA, B. C., CORREA, B., TONELOTTI, C. S., GONÇALEZ, C. R., GIACOMIN, D., GABORIM, D., BUONO, H. C. D., LEONARDI, J. G., SOUZA, L., SALLES, M., CORDEIRO, R., FONSECA, J., NASCIMENTO, A. A interferência do chá de hibisco no processo de emagrecimento em mulheres adultas da cidade de Amparo – São Paulo. **Saúde em Foco**, Edição n° 8