

UNIVERSIDADE FEDERAL DO TRIÂNGULO MINEIRO
Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química
de Minas Gerais

ADRIANA COSTA RODRIGUES

ESTUDO QUÍMICO DAS PÉTALAS, FOLHAS, CÁLICES E SEMENTES DE
Hibiscus sabdariffa L.

UBERABA

2017

ADRIANA COSTA RODRIGUES

ESTUDO QUÍMICO DAS PÉTALAS, FOLHAS, CÁLICES E SEMENTES DE
Hibiscus sabdariffa L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais na Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Amanda Danuello Pivatto

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto

UBERABA

2017

**Catálogo na fonte: Biblioteca da Universidade Federal do
Triângulo Mineiro**

R611e Rodrigues, Adriana Costa
Estudo químico das pétalas, folhas, cálices e sementes de
Hibiscus sabdariffa L. / Adriana Costa Rodrigues. -- 2017.
77 f. : il., fig., graf., tab.

Dissertação (Mestrado em Química) -- Universidade Federal
do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2017

Orientadora: Profa. Dra. Amanda Danuello Pivatto

Coorientador: Prof. Dr. Marcos Pivatto

1. *Hibiscus sabdariffa*. 2. Produtos naturais. 3. Antioxidantes.
4. Leishmaniose. I. Pivatto, Amanda Danuello. II. Universidade
Federal do Triângulo Mineiro. III. Título.

CDU 633.88

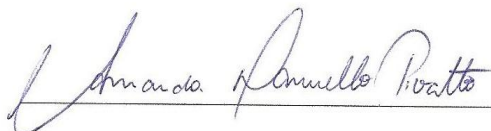
ADRIANA COSTA RODRIGUES

Estudo Químico das Pétalas, Folhas, Cálices e Sementes de *Hibiscus sabdariffa* L.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais, área de concentração Química Orgânica, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.

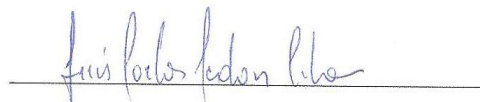
Uberaba, 16 de Fevereiro de 2017.

Banca examinadora:



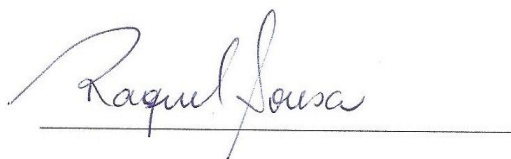
Profa. Dra. Amanda Danuello Pivatto

Universidade Federal do Triângulo Mineiro



Prof. Dr. Luís Carlos Scalon Cunha

Instituto Federal do Triângulo Mineiro



Profa. Dra. Raquel Maria Ferreira de Souza

Universidade Federal de Uberlândia

A José Lázaro,
minhas filhas, Júlia e Luiza
que sempre estiveram
presentes, apoiando
para a realização deste
trabalho

AGRADECIMENTOS

A Deus, primeiramente, pela vida, saúde e a alegria de mais um trabalho realizado.

Ao meu marido José Lázaro Rodrigues pelo carinho, compreensão e incentivo constante.

Às minhas filhas, Júlia e Luiza, pela alegria e incentivo constante.

À Prof.^a Dr.^a Amanda Danuello Pivatto pela orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. Marcos Pivatto por sua coorientação.

À Prof.^a Dr.^a Livia Echternacht Andrade pela identificação e catalogação do material vegetal.

À Prof.^a Dr.^a Carla Regina Costa pela ajuda e amizade.

Ao Prof. Dr. José Roberto Siqueira Júnior pela ajuda e amizade.

Ao Prof. Dr. Guilherme Vannucchi Portari por suas valiosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ricardo Reis Soares pelas análises de espectrometria de massas.

Ao Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, pelas análises de antiprotozoários.

Ao pós graduando Mário Machado Martins da Universidade Federal de Uberlândia - UFU, pelos ensaios realizados e amizade.

Aos servidores, João, Luciene e Cintia, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro - IFTM.

Às amigas de laboratório Alana Kelyene Pereira, Rayla Cristina Gabriel e Kátia Aparecida pelo convívio fraterno.

À Universidade Federal do Triângulo Mineiro - UFTM.

À Universidade Federal de Uberlândia - UFU.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro – IFTM.

Ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Química de Minas Gerais – PPGMQ-MG.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais – FAPEMIG.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

“Não, não pares.
É graça Divina começar bem.
Graça maior,
é persistir na caminhada certa,
manter o ritmo...
Mas a graça das graças
é não desistir.
Prosseguir firme. Podendo ou não podendo.
Caindo embora aos pedaços...
Chegar até ao fim”.

(D. Hélder Câmara)

RESUMO

Hibiscus sabdariffa L. é uma erva aromática, refrescante e adstringente utilizada na medicina popular como diurética, digestiva, antilipêmica, anti-hipertensiva e laxativa. Nas pétalas desta planta é relatada a ocorrência de polifenóis, sendo que vários estudos relacionaram estes metabólitos ao tratamento de doenças renais, estomacais, cardíacas e neurodegenerativas. Grande parte dos estudos realizados com *H. sabdariffa* é limitada aos extratos etanólicos e aquosos dos cálices, devido ao amplo consumo na forma de chá. Neste sentido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil químico dos diferentes órgãos da planta e o potencial antioxidante, uma vez que esta atividade está relacionada ao tratamento de diversas patologias, tais como câncer, doenças cardiovasculares, disfunções cerebrais, doenças degenerativas e processos inflamatórios. Também foi avaliada a atividade leishmanicida uma vez que dados etnofarmacológicos relataram o uso do chá das folhas no tratamento da leishmaniose. Inicialmente, foram coletados cálices, pétalas, folhas e sementes dos quais foram preparados os respectivos extratos etanólicos, que seguido de extração líquido-líquido com solventes de polaridade crescente. Os extratos e frações foram submetidos a prospecção fitoquímica utilizando a cromatografia em camada delgada e diversos reveladores químicos, sendo possível sugerir a presença de esteroides, terpenoides, saponinas, propilpropanoides, fenilpropanoides e flavonoides. No ensaio para avaliação da atividade antioxidante foi possível observar que as frações *n*-butanol ($CE_{50} 64,3 \pm 6,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) e acetato de etila ($CE_{50} 69,3 \pm 8,2 \mu\text{g mL}^{-1}$) das pétalas apresentaram os melhores resultados, o que pode ser justificado pela maior quantidade de fenóis totais ($61,5 \pm 2,8$ e $30,7 \pm 1,7$ mg de EAG/g de amostra, respectivamente). No ensaio para avaliação da atividade leishmanicida foi observado que as frações *n*-hexano das folhas ($CI_{50} 40 \pm 8 \mu\text{g mL}^{-1}$), pétalas ($CI_{50} 83 \pm 16 \mu\text{g mL}^{-1}$) e cálices ($CI_{50} 67 \pm 8 \mu\text{g mL}^{-1}$), apresentaram índices de seletividade de 0,37, 0,66 e 0,16, respectivamente. O extrato etanólico das sementes foi submetido à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, sendo possível observar a presença de uma série de ésteres (hexadecanoato de metila, hexadecanoato de etila, octadeca-9,12-dienoato de metila, 9-octadecenoato de metila, octadecanoato de metila, octadeca-9,12-dienoato de etila, 9-octadecenoato de etila e octadecanoato de etila) e ácidos graxos (ácido hexadecanóico e ácido octadeca-9,12-dienoico) de cadeias longas, contribuindo assim para o conhecimento do perfil químico desta planta que tem ampla aplicação na medicina tradicional.

Palavras-chave: *Hibiscus sabdariffa*, potencial antioxidante, atividade leishmanicida.

ABSTRACT

Hibiscus sabdariffa L. is a refreshing and astringent aromatic herb used in folk medicine as diuretic, digestive, anti-lipemic, antihypertensive and laxative. In the petals of this plant is reported the occurrence of polyphenols, and several studies have related these metabolites to the treatment of kidney, stomach, heart and neurodegenerative diseases. Much of the studies conducted with *H. sabdariffa* are limited to the ethanolic and aqueous extracts of the calyces, due to the large consumption in the form of tea. In this sense, the present work had as objective to evaluate the chemical profile of the different organs of the plant and the antioxidant potential, since this activity is related to the treatment of several pathologies, such as cancer, cardiovascular diseases, cerebral dysfunctions, degenerative diseases and processes inflammatory. Additionally, leishmanicidal activity was evaluated because ethnopharmacological data reported the use of leaves of tea in the treatment of leishmaniasis. Initially, calyces, leaves, petals and seeds were collected from which the respective ethanolic extracts were prepared, followed by liquid-liquid extraction with solvents of increasing polarity. The extracts and fractions were submitted to phytochemical prospecting using thin layer chromatography and several chemical developers, and it was possible to suggest the presence of steroids, terpenoids, saponins, propylpropanoids, phenylpropanoids and flavonoids. In the assay to evaluate the antioxidant activity, it was possible to observe that the fractions *n*-butanol ($EC_{50} 64.3 \pm 6.2 \mu\text{g mL}^{-1}$) and ethyl acetate ($EC_{50} 69.3 \pm 8.2 \mu\text{g mL}^{-1}$) showed the best results, which may be justified by the higher amount of total phenols (61.5 ± 2.8 and $30.7 \pm 1.7 \text{ mg GAE/g sample}$, respectively). In the assay for evaluation of leishmanicidal activity, it was observed that the *n*-hexane fractions of the leaves ($IC_{50} 40 \pm 8 \mu\text{g mL}^{-1}$), petals ($IC_{50} 83 \pm 16 \mu\text{g mL}^{-1}$) and calyces ($IC_{50} 67 \pm 8 \mu\text{g mL}^{-1}$) showed selectivity indexes of 0.37, 0.66 and 0.16, respectively. The ethanolic extract of the seeds was submitted to the analysis by gas chromatography coupled to mass spectrometry being possible to observe the presence of a series of esters (methyl hexadecanoate, ethyl hexadecanoate, methyl octadeca-9,12-dienoate, methyl 9-octadecenoate, methyl octadecanoate, ethyl octadeca-9,12-dienoate, ethyl 9-octadecenoate and ethyl octadecanoate) and fatty acids (hexadecanoic acid and octadeca-9,12-dienoic acid) of long chains, thus contributing to the knowledge of the chemical profile of this plant that has wide application in traditional medicine.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa*, antioxidant potential, leishmanicidal activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Ácido acetil salicílico e penicilina G	14
Figura 2 – Cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	18
Figura 3 – Flores de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	19
Figura 4 – Antocianinas: cianidina 3-O-sambubiosídeo, delphinidina 3-O-sambubiosídeo, cianidina 3-O-glucosídeo e delphinidina 3-O-glucosídeo	20
Figura 5 – Ácido cítrico e pectina	20
Figura 6 – Ácido hibisco, hibisco glucosídeo, hibisco 6-metil éster, gálico, protocatecuico glucosídeo, cafeoilquínicos e quínico.....	21
Figura 7 – Quercetina-3-O-rutinosídeo (rutina).....	22
Figura 8 – Folhas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	22
Figura 9 – Kaempferol.	23
Figura 10 – Sementes de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	24
Figura 11 – Esteróis: sitosterol, ergosterol e campesterol.....	24
Figura 12 – Ácidos hidroxicítrico e hibisco.....	25
Figura 13 – Cultivo de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. em 14/01/2015 (A), 12/03/2015 (B) ...	32
Figura 14 – Coleta das folhas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	32
Figura 15 – Secagem das folhas em estufa com circulação de ar a 45 °C	32
Figura 16 – Material vegetal de <i>H. sabdariffa</i> . In natura: pétalas (A), cálices (B) e sementes (C). Seco: pétalas (A1), cálices (B1) e sementes (C1): Material seco	33
Figura 17 – Moinho de facas: utilizado na trituração das folhas, pétalas, cálices e sementes.....	33
Figura 18 – Extração líquido/líquido do EE-Ca de <i>H. sabdariffa</i>	34
Figura 19 – Extração líquido/líquido do EE-Fo de <i>H. sabdariffa</i>	35
Figura 20 – Extração líquido/líquido do EE-Pe de <i>H. sabdariffa</i>	35
Figura 21 – Extração ácido/base do EE-Ca.....	36
Figura 22 – Extração ácido/base do EE-Fo.....	37
Figura 23 – CCD das frações hexano, inspeção a 254 nm	44
Figura 24 – CCD das frações AcOEt, <i>n</i> -BuOH e hidrometanólica, inspeção a 254 nm	45
Figura 25 – CCD das frações hexano: Cálices (1), Folhas (2) e Pétalas (3) (FM: Hex/AcOEt (6:4)).....	45

Figura 26 – CCD das frações AcOEt, <i>n</i> -BuOH e hidrometanólica: Cálices (1), Folhas (2) e Pétalas (3) (FM AcOEt/HOAc/HCO ₂ H/H ₂ O (100:11:11:26)).....	45
Figura 27 – Reação do ácido gálico com o íon molibdênio	47
Figura 28 – Curva de calibração para o ácido gálico.....	48
Figura 29 – Reação de redução do radical DPPH.....	50
Figura 30 – Consumo do DPPH do Extrato etanólico dos cálices	51
Figura 31 – Consumo do DPPH do Extrato etanólico das folhas	51
Figura 32 – Consumo do DPPH do Extrato etanólico das pétalas	52
Figura 33 – Consumo do DPPH da fração AcOEt dos cálices	52
Figura 34 – Consumo do DPPH da fração <i>n</i> -BuOH dos cálices.....	53
Figura 35 – Consumo do DPPH da fração AcOEt das folhas.....	53
Figura 36 – Consumo do DPPH da fração <i>n</i> -BuOH das folhas	54
Figura 37 – Consumo do DPPH da fração AcOEt das pétalas.....	54
Figura 38 – Consumo do DPPH da fração <i>n</i> -BuOH das pétalas	55
Figura 39 – Cromatograma de íons totais do EE-Se de <i>H. sabdariffa</i>	57
Figura 40 – EM-IE do composto referente ao <i>t_R</i> 44,5 min.....	59
Figura 41 – Proposta de fragmentação para o composto referente ao <i>t_R</i> 44,5 min..	60
Figura 42 – EM-IE do composto referente ao <i>t_R</i> 46,7 min.....	61
Figura 43 – EM-IE do composto referente ao <i>t_R</i> 50,9 min.....	61
Figura 44 – EM-IE do composto referente ao <i>t_R</i> 52,9 min.....	61
Figura 45 – EM-IE do composto referente ao <i>t_R</i> 49,9 min.....	62
Figura 46 – EM-IE do composto referente ao <i>t_R</i> 50,1 min.....	62
Figura 47 – EM-IE do composto referente ao <i>t_R</i> 52,0 min.....	63
Figura 48 – EM-IE do composto referente ao <i>t_R</i> 52,2 min.....	63
Figura 49 – EM-IE do composto referente ao <i>t_R</i> 45,9 min.....	64
Figura 50 – Proposta de fragmentação para o composto referente ao <i>t_R</i> 45,9 min..	64
Figura 51 – EM-IE do composto referente ao <i>t_R</i> 51,4 min	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rendimento da coleta do material vegetal (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.).....	42
Tabela 2 – Rendimento dos extratos etanólicos das folhas, cálices, pétalas e sementes de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	42
Tabela 3 – Extração líquido/líquido de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	43
Tabela 4 – Prospecção química.....	46
Tabela 5 – Fenóis totais dos extratos e frações de <i>H. sabdariffa</i>	48
Tabela 6 – Potencial antioxidante dos extratos e frações de <i>H. sabdariffa</i>	55
Tabela 7 – Substâncias propostas a partir da análise por CG-EM do EE-Se de <i>H. sabdariffa</i>	58
Tabela 8 – Ensaio da atividade leishmanicida com <i>L. amazonensis</i>	67

LISTA DE ABREVIATURAS

AA – atividade antioxidante
AAS – ácido acetil salicílico
AcOEt – acetato de etila
BHI – Brain-Heart Infusion
CCD – cromatografia em camada delgada
CC₅₀ – concentração citotóxica média
CE₅₀ – concentração efetiva média
CI₅₀ – concentração inibitória média
CG-EM – cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
DMEM – Dulbecco's modified Eagle's médium
DMSO – dimetilsulfóxido
DPPH – 2,2-difenil-picrilhidrazila
EAG – Equivalentes de ácido gálico
EE-Ca – extrato etanólico dos cálices
EE-Pe – extrato etanólico das pétalas
EE-Fo – extrato etanólico das folhas
EE-Se – extrato etanólico das sementes
EM – Espectrometria de massas
FE – Fase estacionária
FM – Fase móvel
FT – Fenóis totais
Hex – hexano
HOAc – ácido acético
IA – índice aritmético
Iodocloroplatinato – ICIPt
IS – índice de seletividade
MeOH – metanol
n-BuOH – *n*-butanol
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Phosphate Buffered Saline
RMN – Ressonância magnética nuclear
 t_R – tempo de retenção

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
1.1 PRODUTOS NATURAIS – ASPECTOS GERAIS	14
1.2 CARACTERÍSTICAS DO <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	17
1.2.1 Cálice e flores de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	18
1.2.2 Folhas de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	22
1.2.3 Sementes de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	23
1.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA CONTRA <i>Leishmania amazonensis</i>	25
2 OBJETIVOS	27
3 MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1 INSTRUMENTAÇÃO.....	28
3.2 MATERIAIS UTILIZADOS	28
3.2.1 Reagentes e solventes	28
3.2.2 Cromatografia	29
3.3 REVELADORES UTILIZADOS	29
3.3.1 Revelador ácido fosfomolibdico	29
3.3.2 Revelador anisaldeído	29
3.3.3 Revelador Dragendorff	30
3.3.4 Revelador iodocloroplatinato	30
3.3.5 Revelador Liebermann-Burchard	30
3.3.6 Revelador NP/PEG	30
3.3.7 Revelador vanilina sulfúrica	31
3.4 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL	31
3.5 PREPARO DOS EXTRATOS DE <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	34
3.6 EXTRAÇÃO LÍQUIDO/LÍQUIDO DO EXTRATO ETANÓLICO DOS CÁLICES, FOLHAS E PÉTALAS DE <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	34
3.7 EXTRAÇÃO ÁCIDO/BASE DOS EXTRATOS EE-Ca e EE-Fo	36
3.8 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS (FT) PELO MÉTODO DE FOLIN- CIOCALTEAU	37
3.9 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	38
3.10 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA-ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM) PARA AS SEMENTES.....	39
3.11 ENSAIO LEISHMANICIDA	39

3.12 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE	40
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
4.1 RENDIMENTO DA COLETA DO MATERIAL VEGETAL (<i>H. sabdariffa</i> L.)	42
4.2 RENDIMENTO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS	42
4.3 EXTRAÇÃO LÍQUIDO/LÍQUIDO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	43
4.4 AVALIAÇÃO ALCALOÍDICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DOS CÁLICES E FOLHAS.....	44
4.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DOS CÁLICES, FOLHAS E PÉTALAS POR CCD.....	44
4.6 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU	47
4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH.....	49
4.8 ANÁLISE POR CG-EM DO EXTRATO ETANÓLICO DAS SEMENTES DE <i>H. sabdariffa</i>	56
4.9 ENSAIOS LEISHMANICIDA E DE CITOTOXICIDADE.....	65
5 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS.....	69

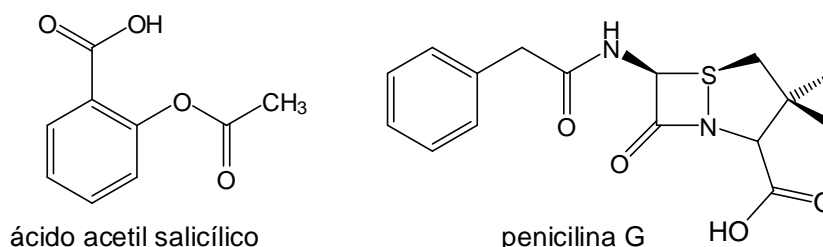
1 INTRODUÇÃO

1.1 PRODUTOS NATURAIS – ASPECTOS GERAIS

Os produtos naturais são utilizados há milhares de anos para tratamento de ferimentos, alívio das dores (BOLZANI; VIEGAS; BARREIRO, 2006) e como corantes, além dos bálsamos que eram utilizados como repelentes e odorizadores (PINTO, 1995). No Brasil, os colonizadores exploraram o pau-brasil até o século XIX que era utilizado exclusivamente como corante para tingimento de roupas e tinta para a escrita (PINTO, 1995).

O conhecimento popular contribui para a pesquisa dos produtos naturais ao longo do tempo, tanto para o conhecimento das estruturas químicas quanto para as propriedades biológicas, como por exemplo, o ácido acetil salicílico (AAS) e a penicilina (Figura 1), ambos com grande impacto na indústria farmacêutica. (BOLZANI; VIEGAS; BARREIRO, 2006).

Figura 1 – Ácido acetil salicílico e penicilina G.



Fonte: Autora, 2017.

No Brasil, as plantas são consideradas a principal fonte de novos fármacos devido às condições favoráveis de coleta do material, à biodiversidade do país e à possibilidade de encontrar novos princípios ativos (BRAZ-FILHO, 2010). Diversas plantas tropicais têm sido utilizadas popularmente e encontram-se documentadas por dados etnobotânicos (BRAZ-FILHO, 2010). Os métodos cromatográficos e espectrométricos, principalmente a espectrometria de massas (EM) e a ressonância magnética nuclear (RMN), são práticas amplamente utilizadas nas investigações metabolômicas (BRAZ-FILHO, 2010).

Os metabólitos são moléculas orgânicas oriundas de reações biossintéticas que

ocorrem em organismos como animais, vegetais e micro-organismos. Esses metabólitos podem ser primários ou secundários, os primários são responsáveis pelas reações essenciais do organismo como a respiração, fotossíntese e transporte de solutos. Os metabólitos secundários consistem na interação química entre os organismos e o ambiente ao seu redor (EMERY; SANTOS; BIANCHI, 2010; GOBBONETO; LOPES, 2007).

Vale destacar que os metabólitos secundários das plantas podem apresentar diversas bioatividades, como a proteção e prevenção contra doenças degenerativas, atuando, por exemplo, como antioxidantes (OBOUAYEBA et al., 2014), que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres (FYNLAYS TEA SOLUTIONS, 2009).

O isolamento e a identificação de compostos orgânicos produzidos pelo metabolismo secundário são de grande importância para a química de produtos naturais e para o avanço de outras atividades científicas e tecnológicas. As substâncias extraídas da flora brasileira têm contribuído para o desenvolvimento social, econômico, científico e tecnológico no país (BRAZ-FILHO, 1994) como, por exemplo, o Hipérico (*Hypericum perforatum*), indicado para tratamento de problemas de depressão oriundo da erva de São João (CORDEIRO et al., 2005) e Fitoscar (*Stryphnodendron adstringens*) indicado como cicatrizante em vários tipos de lesões de pele, oriundo do barbatimão (MENDONÇA, 2011).

As plantas superiores compõem uma das fontes importantes para a descoberta de novas substâncias que além de atuarem como agentes medicinais contribuem com a química orgânica sintética fornecendo modelos estruturais, além de permitir a modificação destas buscando a otimização das propriedades farmacológicas e bioquímicas (BRAZ-FILHO, 2010).

Na busca de novos fármacos, a síntese e avaliação biológica passaram a ter um custo muito elevado, pois poucos compostos venciam as etapas pré-clínicas e clínicas para tornar-se um medicamento. Neste sentido, os produtos naturais recuperaram espaço na indústria farmacêutica como fitoterápicos e como fonte inspiradora de novos padrões moleculares (BOLZANI, VIEGAS, BARREIRO, 2006).

A utilização de medicamentos naturais é uma tendência mundial, tanto que nos últimos dez anos a aplicação de plantas para tratamento de diversas patologias aumentou consideravelmente (OBOUAYEBA et al., 2014).

Por outro lado, Harvey, Edrada-Ebel e Quinn (2015) descreveram que a utilização de produtos naturais para descoberta de novos fármacos diminuiu nas

últimas duas décadas. Em parte, isto ocorreu devido a barreiras técnicas para efetuar as triagens biológicas automatizadas em alta escala (HTS, do inglês *high-throughput screening*) dos produtos naturais em diversos alvos biomoleculares (RISHTON, 2008 apud HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Mesmo considerando este panorama, a pesquisa nesta área ainda é relevante, já que os produtos naturais apresentam uma vasta variedade de grupos farmacofóricos e, muitas vezes, compostos com estereoespecificidade o que possibilita a descoberta de novos candidatos a fármacos. Além disto, estudos revelaram que tais compostos, em muitos casos, não são somente biologicamente ativos como apresentam bons perfis de biodisponibilidade, o que é essencial no desenvolvimento de um medicamento (DREWRY; MACARRON, 2010 apud HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

Estudos fitoquímicos mostram que alcaloides, por exemplo, são amplamente utilizados como agentes quimioterapêuticos do câncer (OCHO-ANIN et al., 2010), as saponinas apresentam propriedades depressoras de hipertensos e cardíacos, além de oferecer estratégia de prevenção do risco de câncer (HALLIWELL, GUTTERIDGE, CROSS, 1992 apud OBOUAYEBA et al., 2014).

Os polifenóis, por exemplo, flavonoides, cumarinas, ácido clorogênico e taninos, são especialmente utilizados como anti-inflamatórios, antivirais e citotóxicas, têm propriedades antioxidantes relevantes (ZHANG, 2011 apud OBOUAYEBA et al., 2014), podem atuar na cura e prevenção de problemas renais e do estômago, doenças neurodegenerativas e outros processos patológicos tais como envelhecimento, doenças coronárias, Alzheimer e cataratas (CHEN et al., 2003 apud OBOUAYEBA et al., 2014).

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

Os taninos diminuem a proliferação bacteriana, bloqueando enzimas chave no metabolismo microbiano, são antioxidantes (TOM et al., 2013 apud OBOUAYEBA et al., 2014), adstringentes, e utilizados para tratar desordens intestinais, tais como diarreia e disenteria (DHARMANANDA, 2003 apud OBOUAYEBA et al., 2014). E as antocianinas são cardioprotetoras, antioxidantes e hepatoprotetoras (WANG et al., 2000 apud OBOUAYEBA et al., 2014).

1.2 CARACTERÍSTICAS DO *Hibiscus sabdariffa* L.

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* Linnaeus é uma herbácea anual, podendo atingir 2,4 m de altura, de fácil cultivo sendo 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 farmacêutica e alimentícia e sua fibra pode ser utilizada em confecções de vestuários, redes de pesca e cordas (BORRÁS-LINARES et al., 2015).

A planta pode ser cultivada tanto em solo rico, quanto pobre de drenagem, possui um período de 4 a 8 meses de crescimento e, durante o cultivo, é ideal ter uma temperatura noturna em torno de 20 °C e 13 horas de sol diárias. *H. sabdariffa* L. é sensível ao frio (MOHAMED et al., 2007) e muita chuva ou alta umidade pode comprometer a qualidade e rendimento da planta (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014).

H. sabdariffa L. é conhecida 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).

Essa planta é conhecida como uma erva aromática, refrescante, adstringente, diurética, antiescorbútica, antisséptica, afrodisíaca, emoliente, digestiva e laxativa. Popularmente, é usada no tratamento de abscessos, câncer, tosse, fraqueza, febre, ressaca e doenças cardíacas (VILASINEE et al., 2005 apud OBOUAYEBA et al., 2014).

H. 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).

1.2.1 Cálice e flores de *Hibiscus sabdariffa*

O cálice (Figura 2), anel externo envolto do fruto, é comumente utilizado em muitos lugares do mundo na forma de bebidas e alimentos como chás, compotas e geleias (LEPENGUE et al., 2009).

Figura 2 – Cálices de *Hibiscus sabdariffa* L.



Fonte: Autora, 2015.

As flores de *H. sabdariffa* L. (Figura 3) são amarelas com um círculo interno (“olho”) rosa ou marrom, se tornam rosa durante a maturação (ESEZOBOR et al., 2016; MOHAMED et al., 2007) e murcham no final do dia (MOHAMED et al., 2007). São consumidas cruas ou cozidas em saladas, para tempero de molhos, sopas e como aromatizante em bolos (OBOUAYEBA et al., 2014). Além disto, os cálices podem ser utilizados no preparo de bebidas à base de ervas, vinhos, bebidas fermentadas, chocolate, sorvete corantes, aromatizante e como ingrediente de rum (IMAIL, IKRAM, NAZRI, 2008 apud DA-COSTA-ROCHA et al., 2014). No Egito elas são usadas para fazer uma bebida refrescante ácida conhecida como Karkade (MOHAMED et al., 2007).

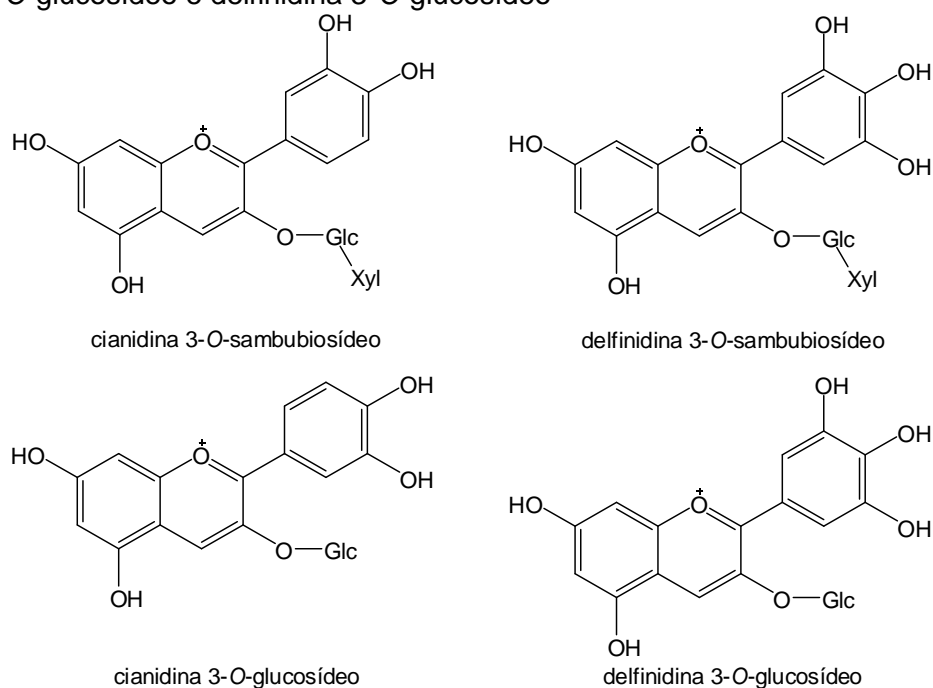
Figura 3 – Flores de *Hibiscus sabdariffa* L.



Fonte: Autora, 2015.

Os componentes químicos das flores secas de *H. sabdariffa* descritos na literatura são: polissacarídeos (mucilagem, pectina e carboidratos), arabinose, galactose, glucose, ramnose e, em menores quantidades, o ácido galacturônico, ácido glucurônico, manose e xilose. Elas são ricas em antocianinas (Figura 4), que compreendem o maior grupo de pigmentos naturais solúveis em água e são responsáveis pela cor vermelha (ESEZOBOR et al., 2016; DA-COSTA-ROCHA et al., 2014), além de possuírem ácido cítrico e pectina (Figura 5) (SINDI; MARSHALL; MORGAN, 2014; LEPENGUE et al., 2009), por isso é útil na preparação de doces e geleias (LEPENGUE et al., 2014).

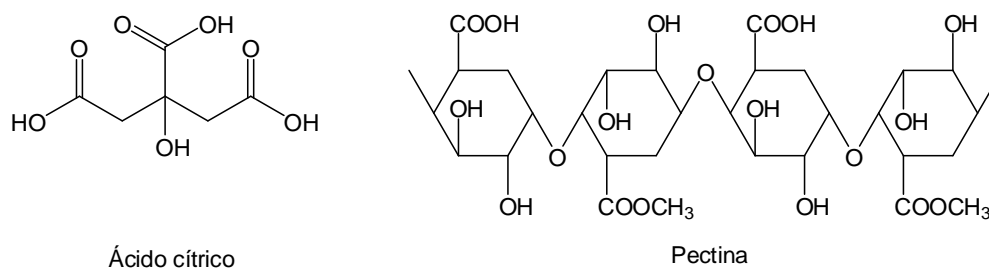
Figura 4 – Antocianinas: cianidina 3-O-sambubiosídeo, delphinidina 3-O-sambubiosídeo, cianidina 3-O-glucosídeo e delphinidina 3-O-glucosídeo



Glc: Glucose; Xyl: xilose

Fonte: Autora, 2017.

Figura 5 - Ácido cítrico e pectina



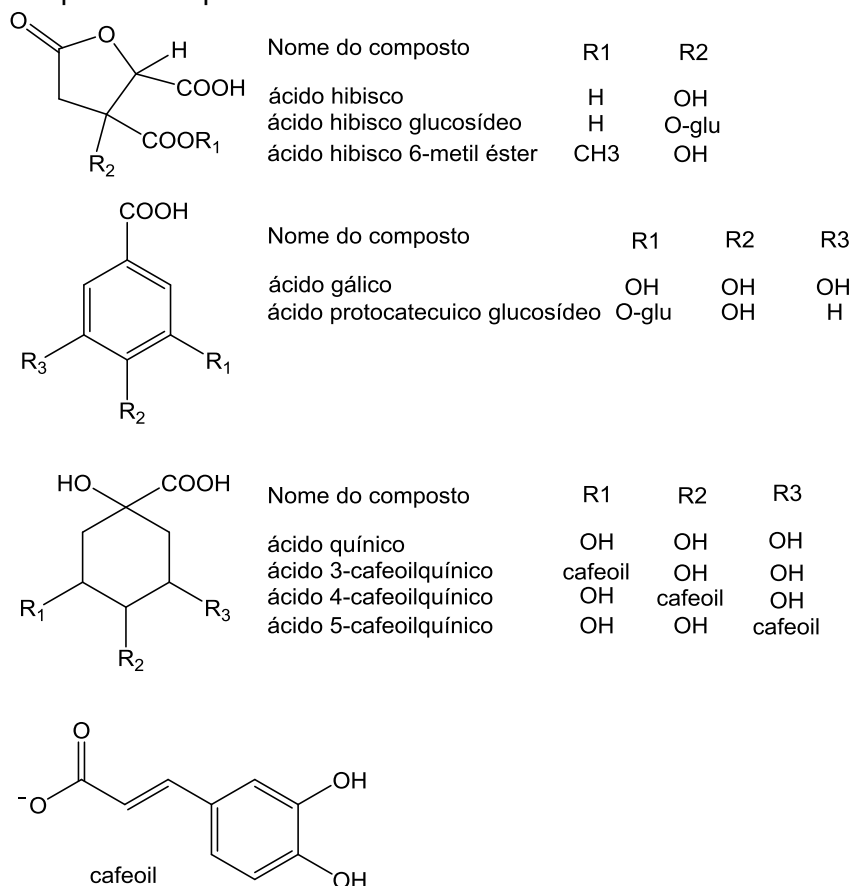
Fonte: Autora, 2017.

Nas pétalas são encontrados os polifenóis, que têm sido alvo de muitas pesquisas pelos seus benefícios à saúde. Vários estudos demonstram atividades biológicas destes metabólitos no tratamento de problemas renais, hipertensão e leucemia, além de ser excelente antioxidante, anti-inflamatória, cardioprotetora, e antibacteriana (OBOUAYEBA et al., 2014).

Ramirez-Rodrigues e seus colaboradores (2011) realizaram um estudo da extração de metabólitos dos cálices frescos e secos utilizando água em duas temperaturas (25 °C e 90 °C) e não observaram alterações nos teores de antocianinas, enquanto que os fenóis foram mais extraídos em água quente do que em água fria. Em

ambos os extratos foi observado o ácido hibisco e dois derivados (ácido hibisco glucosídeo e ácido hibisco 6-metil éster), o ácido gálico, o ácido protocatecuico glucosídeo e os ácidos cafeoilquínicos e quínico (Figura 6) (RAMIREZ-RODRIGUES et al., 2011).

Figura 6 – Ácido hibisco, hibisco glucosídeo, hibisco 6-metil éster, gálico, protocatecuico glucosídeo, cafeoilquínicos e quínico.



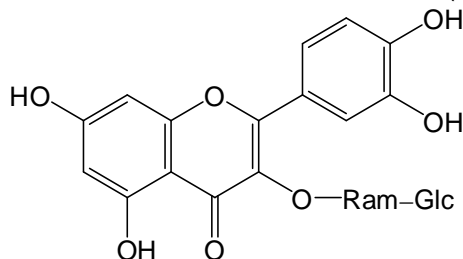
Fonte: Autora, 2017.

As flores têm sido utilizadas no tratamento contra a leucemia devido ao seu alto teor em polifenóis, particularmente o ácido protocatecuico (MOHAMED et al., 2007). Estudos em ratos e coelhos revelaram que o extrato das flores inibiu a ação da lipoproteína (LDL) e diminuiu os níveis de colesterol nestes animais. Posteriormente, pesquisadores em Taiwan realizaram um estudo em humanos com o chá de *H. sabdariffa* e comprovaram a redução dos níveis de colesterol (LIN et al., 2007).

Experiências com aves domésticas mostraram que o extrato dos cálices de *H. sabdariffa* foi capaz de reduzir a intoxicação resultante do consumo de álcool pela queda na sua taxa de absorção pelo organismo (MORTON, 1987 apud ALAGA et al., 2014).

As propriedades antibacterianas do extrato aquoso e etanólico foram avaliadas, sendo que as maiores concentrações de substâncias bioativas foram obtidas no extrato etanólico, enquanto que as saponinas foram extraídas tanto por água quanto por etanol. Os metabólitos encontrados em ordem quantitativa foram: os flavonoides, como a quercetina (Figura 7), e saponinas (ALAGA et al., 2014).

Figura 7 – Quercetina-3-O-rutinosídeo (rutina)



Ram: Raminosídeo; Glc: Glicose

Fonte: Autora, 2017.

1.2.2 Folhas de *Hibiscus sabdariffa*

As folhas (Figura 8) 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). São consumidas cruas ou cozidas em saladas e como tempero em vários países (OBOUAYEBA et al., 2014; ZHEN et al., 2016).

Figura 8 – Folhas de *Hibiscus sabdariffa* L.



Fonte: Autora, 2015.

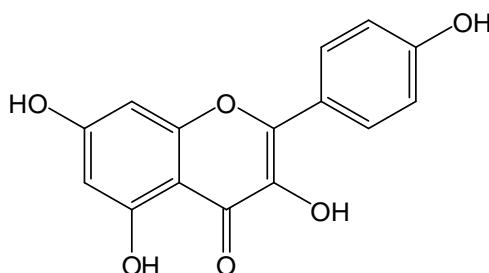
Grande parte dos estudos de *H. sabdariffa* é realizada com os cálices e, apesar

do volume crescente de investigação, são poucos os estudos fitoquímicos das folhas (ZHEN et al., 2014).

Algumas atividades biológicas são atribuídas a extratos deste órgão da planta, tais como: atividade antioxidante moderada, anti-hiperlipidêmica, antiaterosclerótica, antiproliferativa (ZHEN et al., 2016), antisséptico, digestiva, diurética, refrigerante, sedativa e tônico (OLALEYE, 2007).

Os principais constituintes químicos presentes na folha de *H. sabdariffa* são os ácidos fenólicos e os flavonoides (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) (Figura 6) e os flavonoides, quercetina (Figura 7) e kaempferol (Figura 9) que possuem atividade anti-inflamatória (RODRÍGUEZ-MEDINA, et al., 2009).

Figura 9 - Kaempferol



Fonte: Autora, 2017.

1.2.3 Sementes de *Hibiscus sabdariffa*

As sementes (Figura 10), na África, são moídas e consumidas como farinha devido ao seu alto teor de proteínas e também são torradas para utilizar como substituto para o café (MORTON, 1987 apud MOHD-ESA et al., 2010). No norte da Nigéria as sementes são fermentadas na presença de algumas especiarias para preparar um alimento conhecido como Mungza Ntusa (MOHAMED et al., 2007).

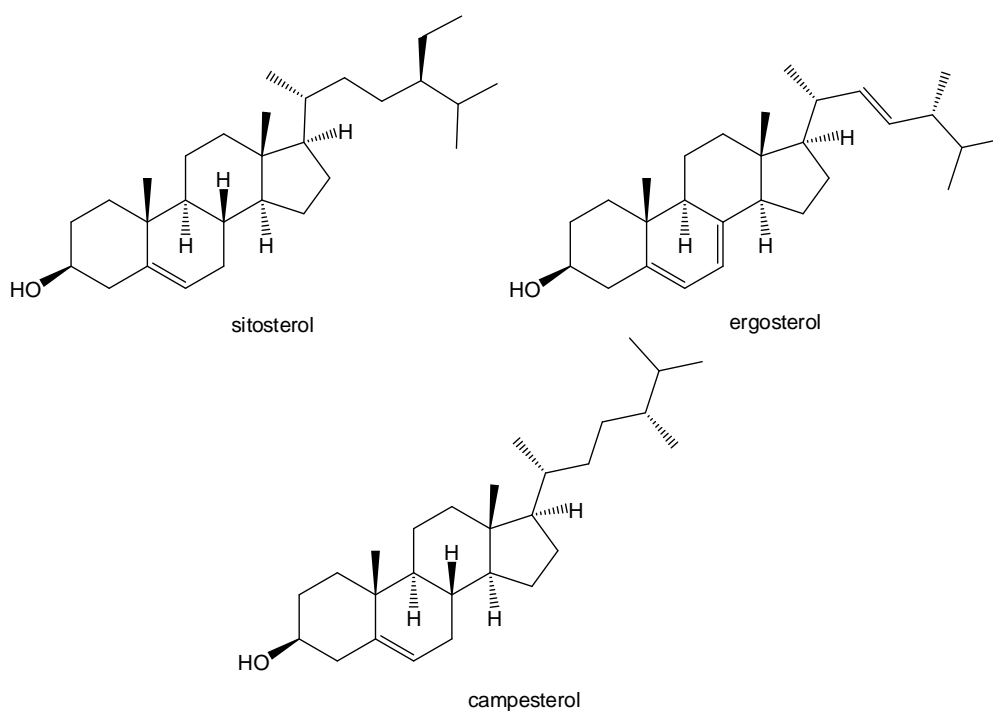
Figura 10 – Sementes de *Hibiscus sabdariffa* L.



Fonte: Autora, 2015.

Nas sementes de *H. sabdariffa* é encontrado uma quantidade de óleo que se assemelha ao encontrado na semente de algodão (MOHAMED et al., 2007). Possuem um grupo de compostos menos polares como os esteróis sitosterol, ergosterol e campesterol (Figura 11) (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014; BORRÁS-LINARES, et al., 2015).

Figura 11 – Esteróis: sitosterol, ergosterol e campesterol

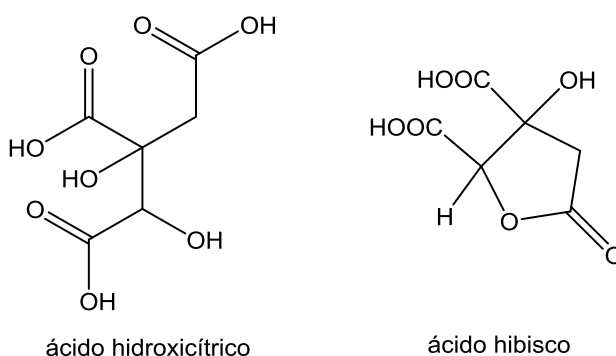


Fonte: Autora, 2017.

É possível identificar a presença de componentes voláteis no óleo das

sementes, constituídos principalmente por hidrocarbonetos insaturados, álcoois e aldeídos com número de carbonos entre 8 e 13. Em estudos posteriores, foi comprovada a presença de 37 compostos voláteis em cinco diferentes variedades de *Hibiscus sabdariffa* que podem ser classificados em álcoois, aldeídos, cetonas, terpenos e ácidos, como o ácido hidroxicítrico e hibisco (Figura 12) (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014).

Figura 12 – Ácidos hidroxicítrico e hibisco.



Fonte: Autora, 2017.

Grande parte dos estudos realizados com *Hibiscus sabdariffa* L. são limitados aos extratos etanólicos e aquosos dos cálices, devido ao amplo consumo desta planta na forma de chá. Entretanto, considerando suas propriedades medicinais, é relevante avaliar o perfil químico dos diferentes órgãos da planta, assim como avaliar o potencial antioxidante, uma vez que esta atividade está relacionada ao tratamento de diversas patologias, tais como câncer, doenças cardiovasculares, cataratas, disfunções cerebrais, doenças degenerativas e processos inflamatórios (RAMOS et al., 2011).

Além disto, dados etnofarmacológicos descritos por Odonne e colaboradores (2011) revelaram que as folhas e caules de *H. sabdariffa* são utilizados na forma de suco como forma alternativa para a profilaxia da leishmaniose cutânea (ODONNE et al., 2011). Nesse sentido, é interessante avaliar o potencial leishmanicida dos diferentes órgãos da planta.

1.3 ATIVIDADE BIOLÓGICA CONTRA *Leishmania amazonensis*

A leishmaniose é uma doença causada por diferentes protozoários do gênero *Leishmania*. Os parasitas são transmitidos através da picada do mosquito (mosquito-

palha) infectado. É uma das doenças mais negligenciadas no mundo; dois milhões de novos casos ocorrem anualmente (WHO, 2010).

A manifestação pode ser cutânea ou visceral, podendo atingir crianças, idosos e pessoas com outras doenças crônicas. Em 2010, os especialistas da OMS recomendaram, para o tratamento da leishmaniose, o uso de testes rápidos de diagnóstico, controle dos detalhes das infecções com outras doenças crônicas, além de fatores sociais e mudanças climáticas como fatores de risco (WHO, 2010).

Estima-se que mais de 90% dos casos de leishmania visceral está concentrada em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Nepal e Sudão; e até 90% dos casos de leishmania cutânea ocorrem no Afeganistão, Argélia, República Islâmica do Irã, Arábia Saudita, Síria, Bolívia, Colômbia, Nicarágua, Peru e Brasil. Na Índia, estudos realizados sugeriu que cerca de 20% dos pacientes com leishmaniose visceral, pobres e mulheres, morreram antes do seu reconhecimento (WHO, 2010).

Na última década, foi dada uma atenção considerável às plantas na busca por novos compostos leishmanicidas, já que os produtos naturais são uma fonte preciosa de novas arquiteturas moleculares (RIBEIRO et al., 2014).

Existem poucos fármacos disponíveis no mercado para o tratamento dessa patologia, sendo que todos são tóxicos. Além disto, a resistência parasitária vem aumentando de maneira alarmante nos últimos anos. Considerando esse panorama, a busca de novas alternativas terapêuticas para o tratamento da leishmaniose é um tema relevante (RIBEIRO et al., 2014).

2 OBJETIVOS

- 1) Estudo químico das pétalas, folhas, cálices e sementes de *Hibiscus sabdariffa* L.
- 2) Comparar o perfil químico destes órgãos.
- 3) Avaliar o potencial antioxidante e leishmanicida dos diferentes órgãos da planta.
- 4) Avaliar a citotoxicidade dos extratos e frações dos diferentes órgãos da planta.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 INSTRUMENTAÇÃO

- ✓ Balança analítica – Shimadzu (modelo AY220)
- ✓ Estufa (modelo DeLeo), com circulação de ar;
- ✓ Moinho de facas (modelo Willye Star FT50 – Fortinox);
- ✓ Rotaevaporador da marca Tecnal (modelo TE-2005), com banho a 45 °C e refrigeração a 8 °C;
- ✓ Espectrofotômetro (UV-VIS Spectrophotometer) da marca Thermo (modelo GENESYS 10S);
- ✓ Cromatógrafo gasoso acoplada a espectro de massas – Shimadzu (modelo GC2010/QP5010).

3.2 MATERIAIS UTILIZADOS

3.2.1 Reagentes e solventes

Acetato de etila ($C_4H_8O_2$): CRO – Cromato Produtos Químicos PA

Ácido acético glacial (H_3CCO_2H): Quemis PA ACS

Ácido clorídrico (HCl): Vetec PA

Ácido fórmico (HCO_2H): Real Química

Ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$): INLAB

Ácido gálico ($C_7H_6O_5$): Vetec PA

Ácido sulfúrico (H_2SO_4): Quemis PA ACS

Carbonato de sódio (Na_2CO_3): Reagen PA

Clorofórmio ($CHCl_3$): Proquímios

Diclorometano (CH_2Cl_2): Vetec PA

Etanol (C_2H_5OH): Cromoline PA

Hidróxido de amônio (NH_4OH): Vetec PA

Hexano (C_6H_{14}): Proquímios PA

Metanol (CH_3OH): Sigma Aldrich HPLC

n-Butanol (C_4H_9OH): Êxodo científica PA ACS

p-anisaldeído ($C_8H_8O_2$): Sigma Aldrich

Reagente de Folin-Ciocalteu ($H_3PMo_{12}O_{40}$ e $H_3PW_{12}O_{40}$): Cromoline PA

Vanilina ($C_8H_8O_3$): Isofor PA

2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) ($C_{18}H_{12}N_5O_6$): Sigma Aldrich PA

3.2.2 Cromatografia

Para a cromatografia em camada delgada (CCD) foi utilizada como fase estacionária sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV254) 0,20 mm de espessura (Macherey-Nagel).

3.3 REVELADORES UTILIZADOS

As visualizações em placas cromatográficas utilizaram os seguintes reveladores

3.3.1 Revelador ácido fosfomolibdico

Solução de ácido fosfomolibdico em etanol 20% (m/v) (WAGNER; BLADT, 1996).

Detecta: substâncias redutoras (antioxidantes, ácido ascórbico, vitamina E, esteroides, ácidos biliares, lipídeos, fosfolipídeos, ácidos graxos ou seus ésteres metílicos, triglicerídeos, prostaglandinas, fenóis e terpenos) (JORK, et al, 1990).

3.3.2 Revelador anisaldeído

Um volume de 0,5 mL de anisaldeído é misturado com 10 mL de ácido acético glacial, 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem (WAGNER; BLADT, 1996).

Detecta: antioxidantes, esteroides, prostaglandinas, carboidratos, fenóis, glicosídeos, saponinas, terpenos, antibióticos (macrolídeos e tetraciclina) e micotoxinas (JORK, et al, 1990).

3.3.3 Revelador Dragendorff

Solução A: 0,85 g de nitrato de bismuto em solução de 10 mL de ácido acético glacial e 40 mL de água.

Solução B: 8,0 g de iodeto de potássio (KI) em 30 mL de água.

Solução estoque: misturar A + B na proporção 1:1

Solução spray: 1 mL da solução estoque + 2 mL de ácido acético + 10 mL de água.

Detecta: alcaloides (WAGNER; BLADT, 1996).

3.3.4 Revelador iodocloroplatinato

Solução A: Solução aquosa a 5% (m/m) de ácido hexacloroplatínico IV.

Solução B: Solução aquosa a 10% (m/m) de iodeto de potássio.

Solução spray: 1 mL da solução A + 9 mL da solução B + 10 mL de água (WAGNER; BLADT, 1996).

Detecta: compostos nitrogenados, compostos de amônio quaternário, tióis, tioéteres, sulfóxidos, cetosteroides e vitaminas (JORK, et al, 1990).

3.3.5 Revelador Liebermann-Burchard

Solução: 5 mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado são adicionados cuidadosamente em 50 mL de etanol sob banho de gelo.

Detecta: Triterpenos (WAGNER; BLADT, 1996).

3.3.6 Revelador NP/PEG

Solução A: ácido β -etilaminodifenilbórico éster 1% em metanol

Solução B: polietilenoglicol-4000 5% em etanol.

Solução spray: 10 mL da solução A + 8 mL da solução B.

Detecta: Flavonoides (WAGNER; BLADT, 1996).

3.3.7 Revelador vanilina sulfúrica

Solução A: Vanilina em etanol 1% (m/v).

Solução B: Ácido sulfúrico 10% em etanol (v/v).

Solução spray: Borrifar A e imediatamente B (WAGNER; BLADT, 1996).

Detecta: esteroides, esteróis, triterpenos, prostaglandinas e saponinas (JORK, et al, 1990).

3.4 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

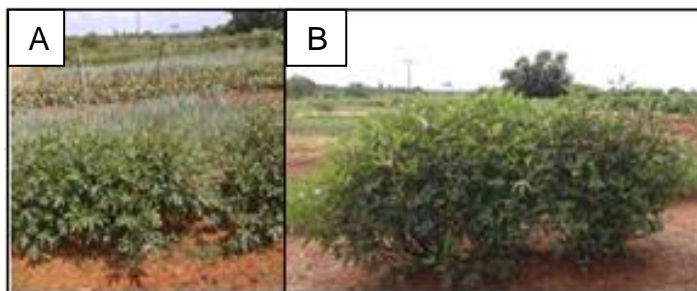
As pétalas, folhas, cálices e sementes de *Hibiscus sabdariffa* L. foram obtidos a partir do material vegetal coletado no Instituto Federal do Triângulo Mineiro – Uberaba/MG, cuja exsicata foi enviada para a profa. Dra. Livia Echternacht Andrade, curadora do herbário da Universidade Federal de Uberlândia (Herbarium Uberlandense - HUFU). A determinação taxonômica foi feita pelo especialista Aluisio Fernandes Júnior, sendo que a exsicata está depositada no HUFU sob o nº 68457.

As folhas foram coletadas em 13 de abril de 2015 (coordenadas S: 19° 39' 42,45"; O: 47° 57' 45,86" e altitude 781,1m) (Figuras 13 e 14). O material coletado foi colocado em sacos de papel, levados para o laboratório e secos em estufa com circulação de ar a 45 °C por cinco dias (Figura 15).

As pétalas foram coletadas nos dias 21, 22, 28 de maio, e 03 e 09 de junho de 2015 (início do período de floração). O material coletado foi armazenado em caixas de papel, transportado para o laboratório e seco em estufa. Os cálices e sementes foram coletados no dia 17 de junho de 2015 (final do período de floração), transportados para o laboratório e secos em estufa com circulação de ar a 45° C (Figura 16). As coletas foram realizadas no período da manhã com tempo limpo e temperatura em média de 24 °C.

Folhas, pétalas, sementes e cálices depois de secos foram triturados em moinho de facas (Figura 17) obtendo-se assim o material seco, triturado e pesado, os quais foram submetidos à extração com etanol.

Figura 13 – Cultivo de *Hibiscus sabdariffa* L. em 14/01/2015 (A), 12/03/2015 (B).



Fonte: Autora, 2015.

Figura 14 – Coleta das folhas de *Hibiscus sabdariffa* L.



Fonte: Autora, 2015.

Figura 15 – Secagem das folhas em estufa com circulação de ar.



Fonte: Autora, 2015.

Figura 16 – Material vegetal de *H. sabdariffa*. *In natura*: pétalas (A), cálices (B) e sementes (C); Seco: pétalas (A1), cálices (B1) e sementes (C1); Material seco.



Fonte: Autora, 2015.

Figura 17 – Moinho de facas: utilizado na trituração das folhas, pétalas, cálices e sementes.



Fonte: Autora, 2015.

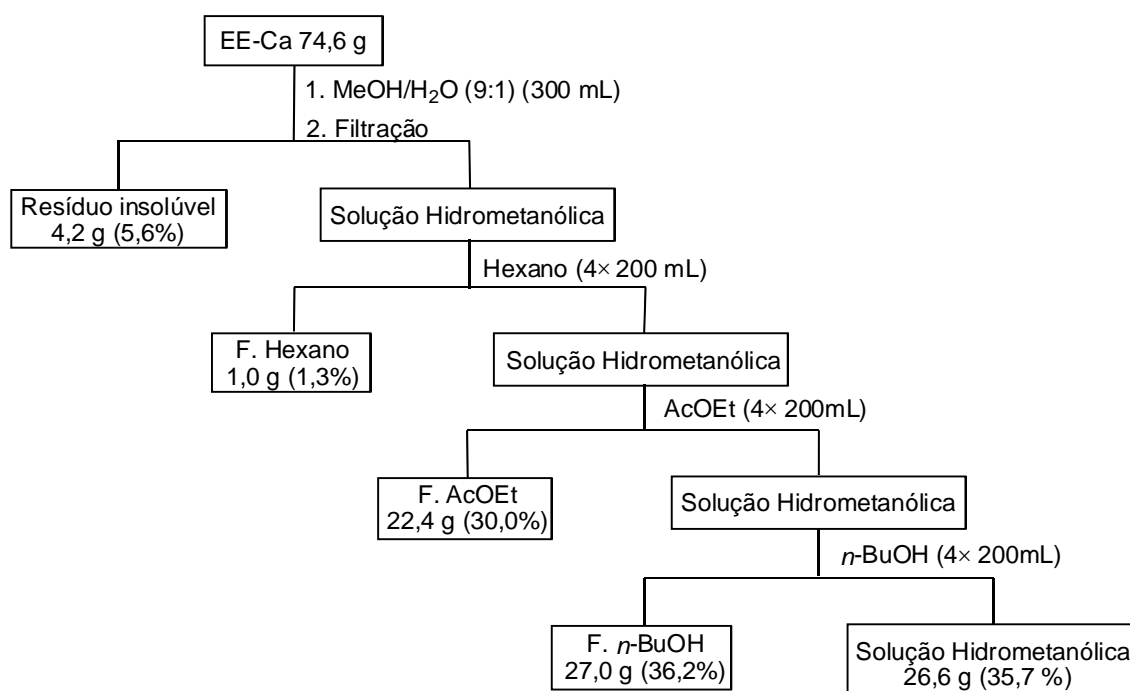
3.5 PREPARO DOS EXTRATOS DE *Hibiscus sabdariffa* L.

Os cálices, folhas, pétalas e sementes foram submetidos à extração com etanol, com intervalo de quatro dias entre uma extração e outra, sendo este processo repetido até a exaustão assim, foi realizado três vezes para as pétalas, cinco vezes para as folhas e quatro vezes para os cálices e sementes. O material vegetal com etanol foi mantido à temperatura ambiente sem exposição à luz durante os intervalos de cada extração. Em seguida o etanol foi filtrado e o solvente evaporado em evaporador rotativo (ALAGA et al., 2014; SOUSA et al., 2007).

3.6 EXTRAÇÃO LÍQUIDO/LÍQUIDO DO EXTRATO ETANÓLICO DOS CÁLCICES, FOLHAS E PÉTALAS DE *Hibiscus sabdariffa* L.

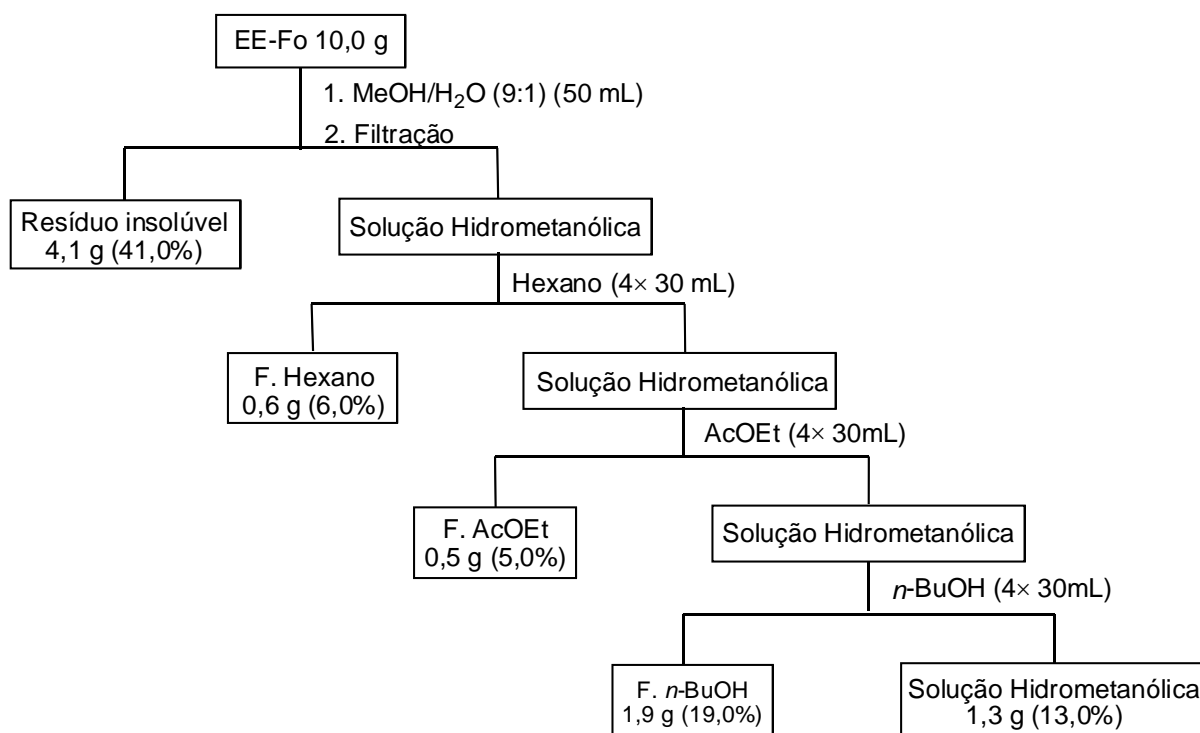
Os extratos etanólicos dos cálices (EE-Ca) (74,6 g), das folhas (EE-Fo) (10,0 g) e das pétalas (EE-Pe) (10,0 g), foram solubilizados em metanol/água (9:1) e em seguida submetidos a extração líquido-líquido com hexano, AcOEt e *n*-BuOH (Figuras 18–20). O extrato etanólico das sementes não foi submetido à extração líquido/líquido por apresentar característica oleosa.

Figura 18 – Extração líquido/líquido do EE-Ca de *H. sabdariffa*.



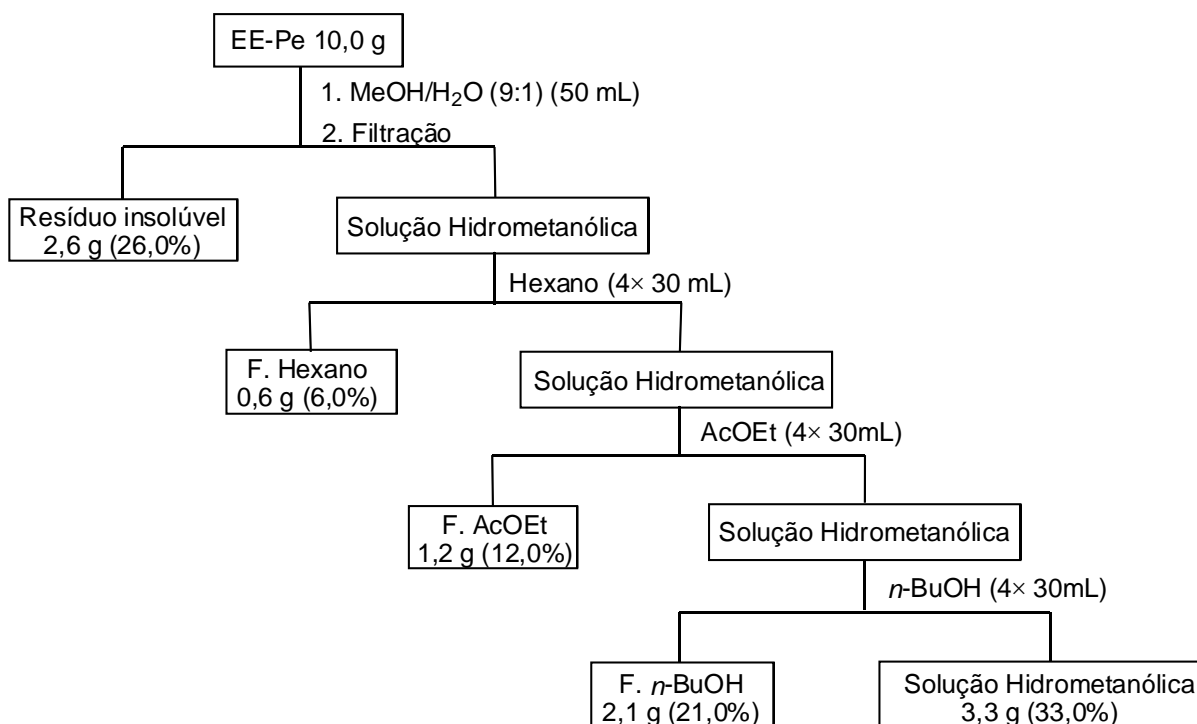
Fonte: Autora, 2015.

Figura 19 – Extração líquido/líquido do EE-Fo de *H. sabdariffa*.



Fonte: Autora, 2015.

Figura 20 – Extração líquido/líquido do EE-Pe de *H. sabdariffa*.

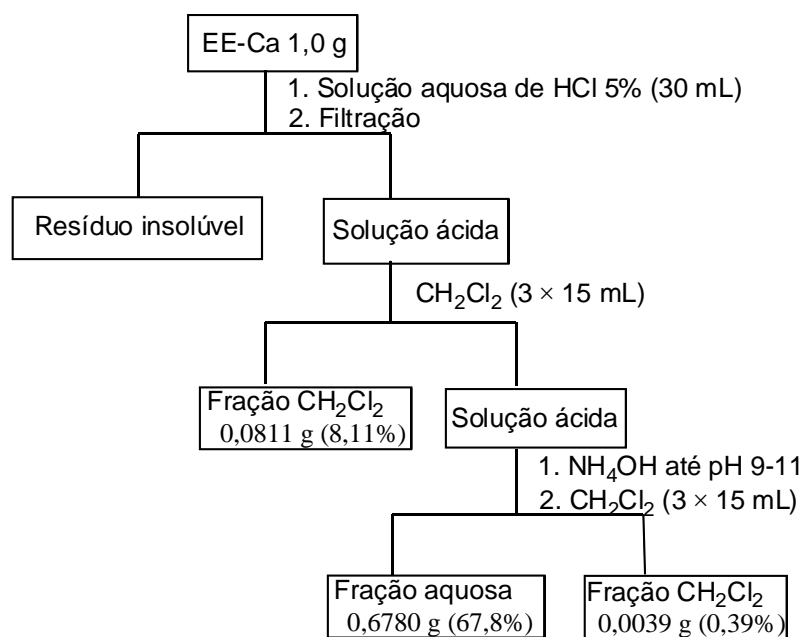


Fonte: Autora, 2015.

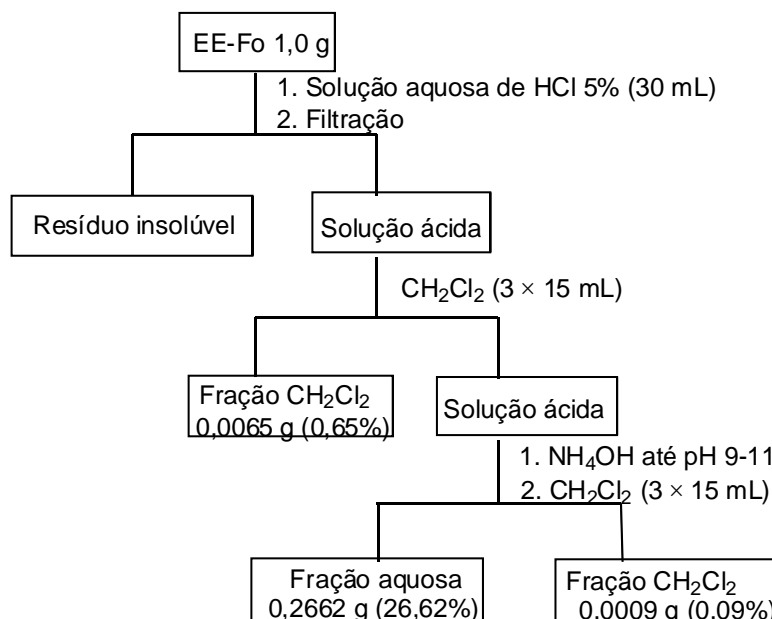
3.7 EXTRAÇÃO ÁCIDO/BASE DOS EXTRATOS EE-Ca e EE-Fo

Os extratos EE-Ca e EE-Fo foram submetidos à extração ácido/base (Figuras 21 e 22). Inicialmente 1,0 g de cada um dos extratos foi solubilizado em 30 mL de HCl (5%), filtrado e submetido a extração líquido-líquido com diclorometano (3×15 mL). Em seguida foi adicionado NH_4OH (30%) até pH 10 e a solução aquosa submetida novamente a extração líquido-líquido com diclorometano (3×15 mL). O solvente da fração orgânica foi evaporado e em seguida esta fração foi submetida à CCD utilizando sílica gel como fase estacionária (FE) e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (9:1:0,25) como fase móvel (FM). Depois de desenvolvidas, as placas foram reveladas sob luz UV 254 ou 365 nm ou aspergidas com os reveladores iodocloroplatinato (ICIPt) e Dragendorff, específicos para identificação de alcaloides (FRANCISCO et al, 2012; AZEVEDO et al, 2014).

Figura 21 – Extração ácido/base do EE-Ca



Fonte: Autora, 2015.

Figura 22 – Extração ácido/base do EE-Fo

Fonte: Autora, 2015.

3.8 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS (FT) PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU

Para determinar os FT foi preparada uma solução de $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol dos extratos etanólicos dos cálices, folhas, pétalas e sementes (EE-Se), e das frações AcOEt, *n*-BuOH, hexânica e hidrometanólica dos cálices, folhas e pétalas. De cada solução, retirou-se uma alíquota de 0,5 mL que foi adicionada em um tubo de ensaio e foram misturados 2,5 mL do reagente Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi homogeneizada e incubada por cinco minutos em banho a $50 \text{ }^\circ\text{C}$, resfriada e, em seguida, mediu-se a absorbância no comprimento de onda de 760 nm, contra um branco. O teor de FT foi determinado por interpolação da absorbância da amostra com uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (0,781, 1,562, 3,125, 6,250 e $12,50 \text{ mg mL}^{-1}$) e os resultados, em triplicatas, expressos em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato (SOUSA et al, 2007; CARVALHO et al, 2012).

3.9 AVALIAÇÃO QUANTITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A atividade antioxidante foi determinada utilizando o radical livre DPPH. Foram preparadas soluções em metanol de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as frações AcOEt e *n*-BuOH das pétalas, $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o extrato etanólico das pétalas, $750 \mu\text{g mL}^{-1}$ para a fração *n*-BuOH das folhas, $1500 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos etanólicos dos cálices e folhas e frações AcOEt e *n*-BuOH dos cálices e $5000 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o extrato etanólico das sementes e as frações hexânica e hidrometanólica dos cálices, folhas e pétalas.

A partir das soluções preparadas foram realizadas diluições de 100, 83, 66, 49, 32 e 15%. Para cada uma das soluções diluídas, tomou-se uma alíquota de 0,30 mL da amostra a ser analisada e adicionou 2,7 mL de solução de radical DPPH de concentração $35 \mu\text{g mL}^{-1}$. Além disso, foi feito um branco da amostra nas mesmas condições, porém sem o radical DPPH. Após a adição de radical DPPH, as soluções foram deixadas em repouso durante uma hora e suas absorvâncias registradas, em triplicata, no comprimento de onda de 516 nm. A porcentagem de DPPH sequestrado, que determina a atividade antioxidante, foi determinada pela equação 1.

$$\text{DPPH}_{\text{sequestrado}} (\%) = \frac{\text{AbvC1} - (\text{AbvA} - \text{AbvC2}) \times 100}{\text{AbvC1}} \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

AbvC1 corresponde à absorvância do controle 1 (0,30 mL de metanol + 2,7 mL de DPPH);

AbvA corresponde à absorvância da amostra ao final de 60 minutos (0,30 mL da amostra + 2,7 mL de DPPH);

AbvC2 corresponde à absorvância do controle 2 (0,30 mL da amostra + 2,7 mL de metanol).

A concentração efetiva média (CE_{50}), que representa a concentração de amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH foi determinada plotando-se a porcentagem de radical DPPH sequestrado *versus* as concentrações das amostras de cada extrato e frações (ARGOLO et al, 2004).

3.10 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA-ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM) PARA AS SEMENTES

As análises de CG-EM foram realizadas na Universidade Federal de Uberlândia, no laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química.

A separação e identificação dos constituintes foram feitas utilizando a cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) usando uma coluna polar DB-5, capilar de 30 m × 0,25 mm de diâmetro interno e de 0,25 µm de espessura. Para a análise cromatográfica foi utilizada uma rampa de aquecimento de 60–246 °C (3 °C min⁻¹), injetor no modo splitless a 220 °C; hélio como gás de arraste a fluxo constante de 1,7 mL min⁻¹. No espectrômetro de massas foi utilizada 70 eV como energia de ionização, sendo registrados os fragmentos de *m/z* 40 a 400 *u*; interface a 240 °C; temperatura da fonte de íons a 240 °C; volume injetado 1,0 µL. A identificação dos compostos foi realizada por comparação com bibliotecas de espectros de massas (similaridade 90%) da Wiley (7, 139 e 229), NIST (8, 27 e 147), SHIM2205 e por índices Kovats (índice calculado e teórico). Uma mistura dos padrões de alcanos C₁₀–C₄₀ foi submetida às mesmas condições cromatográficas, de onde foram obtidos os respectivos tempos de retenção, necessários para a determinação do índice aritmético, o qual foi calculado a partir da equação 2 (ADAMS, 2007).

$$AI(x) = 100 P_z + 100 [(RT(x) - RT(P_z)) / (RT(P_{z+1}) - RT(P_z))] \quad (\text{equação 2})$$

Onde:

AI(x) corresponde ao índice aritmético;

P_z corresponde ao número de carbono do alcano de tempo de retenção anterior ao analisado;

RT(x) corresponde ao tempo de retenção do composto analisado;

RT(P_z) corresponde ao tempo de retenção do alcano anterior;

RT(P_{z+1}) corresponde ao tempo de retenção do alcano posterior;

3.11 ENSAIO LEISHMANICIDA

O ensaio leishmanicida foi realizado sob supervisão do Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

As amostras foram solubilizadas em DMSO (dimetilsulfóxido) e diluídas com caldo BHI (Brian-Heart Infusion), para obtenção de uma solução estoque de $640 \mu\text{g mL}^{-1}$. O teste de viabilidade celular foi realizado utilizando a fase promastigota de *Leishmania amazonensis* (cepa PH8). A análise foi realizada pelo método de microdiluição em placas de 96 poços, sendo testadas as concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, preparadas a partir da solução estoque, sendo que a concentração de DMSO não excedeu 1%. O volume final em cada poço foi de $100 \mu\text{L}$, sendo $20 \mu\text{L}$ do inóculo (1×10^8 parasitas em 2 mL) e $80 \mu\text{L}$ de amostra. Controles de crescimento, positivo, solvente e da amostra foram preparados em cada placa. A placa foi incubada durante 48 horas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$, em sequência foram adicionados $2 \mu\text{L}$ de uma solução de resazurina 3 mM em PBS (Phosphate Buffered Saline) a cada poço e incubados novamente durante 24 horas a $25 \text{ }^\circ\text{C}$. No final deste período, foi utilizado um espectrofotômetro de microplaca para determinar a absorbância de cada poço da placa em 595 nm (ROLÓN et al., 2006). A partir dos resultados das absorbâncias, a viabilidade celular foi calculada em função do controle de crescimento. Para a determinação da concentração necessária para inibir 50% dos parasitas (CI_{50}) foi construído um gráfico de dose resposta utilizando o método de regressão não linear. Todos os testes foram realizados em triplicata (PILLAY et al., 2007).

3.12 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

O ensaio de citotoxicidade foi realizado sob supervisão do Prof. Dr. Cláudio Vieira da Silva do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia. As amostras foram solubilizadas em DMSO e diluídas com DMEM (Dulbecco's modified Eagle's médium) (suplementado com 10% de soro fetal bovino), para obtenção de solução estoque na concentração de $640 \mu\text{g mL}^{-1}$. A análise foi realizada utilizando o método de microdiluição em placa de 96 poços. Foram adicionados $100 \mu\text{L}$ de solução com as células (1×10^6 células em 10 mL) em cada poço do teste e incubado por 6 horas em estufa à $37 \text{ }^\circ\text{C}$, com 5% CO_2 e atmosfera úmida, para que as células aderissem ao fundo do poço. Em seguida foi retirado todo o meio de cultura e adicionado a amostra nas concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e $4 \mu\text{g mL}^{-1}$, a partir da solução estoque, sendo que a concentração de DMSO não excedeu 1%. Os controles de crescimento, negativo (100% células lisadas) e solvente também foram preparados. Posteriormente, a placa foi incubada durante 48

horas à 37 °C, com 5% CO₂ em atmosfera úmida. Em sequência foram adicionados 10 µL de uma solução de resazurina 3 mM em PBS a cada poço e incubados novamente durante 24 horas nas mesmas condições (ROLÓN et al., 2006). No final deste período, foi utilizado um espectrofotômetro de microplaca para determinar a absorbância de cada poço da placa em 595 nm. A partir dos resultados das absorbâncias, a viabilidade celular foi calculada em função do controle crescimento. Para a determinação da concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) foi construído um gráfico de dose resposta utilizando o método de regressão não linear. Todos os testes foram realizados em triplicata (PILLAY et al., 2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 RENDIMENTO DA COLETA DO MATERIAL VEGETAL (*H. sabdariffa* L.)

Os rendimentos das coletas das folhas, pétalas, cálices e sementes de *H. sabdariffa* foram obtidos depois de secos, triturados e pesados (Tabela 1).

Tabela 1 - Rendimento da coleta do material vegetal (*Hibiscus sabdariffa* L.)

^a MV	Massa <i>in natura</i> (Kg)	Massa seca (Kg)	Umidade (%)
Folhas	5,0	0,7	86,1
Cálices	4,4	0,6	86,4
Pétalas	5,5	0,3	94,8
Sementes	1,7	0,4	78,1

^aMV: Material vegetal.

4.2 RENDIMENTO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS

Após a extração dos materiais vegetais com etanol e evaporação do solvente, os rendimentos foram calculados (Tabela 2). Foi observado maior rendimento para o extrato etanólico dos cálices de *Hibiscus sabdariffa* L., indicando grande quantidade de metabólitos.

Tabela 2 – Rendimento dos extratos etanólicos das folhas, cálices, pétalas e sementes de *Hibiscus sabdariffa* L.




^a MV	Extração (g)					Rendimento	
	1 ^a	2 ^a	3 ^a	4 ^a	5 ^a	(g)	(%)
Folhas	25,6	43,4	23,4	12,5	12,0	116,9	16,8
Cálices	80,7	85,8	30,6	11,7	-	208,7	34,7
Pétalas	8,8	7,6	4,5	-	-	21,0	7,2
Sementes	13,9	9,6	5,5	3,0	-	31,9	8,6

^aMV: Material vegetal.

4.3 EXTRAÇÃO LÍQUIDO/LÍQUIDO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE *Hibiscus sabdariffa* L.

Os extratos etanólicos (EEs) das folhas, cálices e pétalas foram submetidos à extração líquido/líquido com hexano, AcOEt e *n*-butanol e os rendimentos das frações em relação aos EEs foram calculados (Tabela 3).

Tabela 3 – Extração líquido/líquido de *Hibiscus sabdariffa* L.

^a MV	Fração				
	Hexano (g/%)	AcOEt (g/%)	<i>n</i> -BuOH (g/%)	Hidrometanólica (g/%)	Material insolúvel (g/%)
^b folhas 	0,6/6,0	0,5/5,0	1,9/19,0	1,3/13,0	4,1/41,0
^b pétalas 	0,6/6,0	1,2/12,0	2,1/21,0	3,3/33,0	2,6/26,0
^b cálices 	1,0/1,3	22,4/30,0	27,0/36,2	26,6/35,7	4,2/5,6

^aMV: Material vegetal. ^bExtrato etanólico

Os melhores resultados de rendimentos das frações podem ser observados na fração *n*-BuOH de todos os órgãos submetidos à extração líquido/líquido. Neste sentido, é possível sugerir que nessa fração *n*-BuOH, presença de compostos de maior polaridade, pode apresentar maior potencial antioxidante. As frações das folhas apresentaram os menores rendimentos, devido à quantidade de material insolúvel obtida na extração líquido/líquido.

4.4 AVALIAÇÃO ALCALOÍDICA DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DOS CÁLICES E FOLHAS

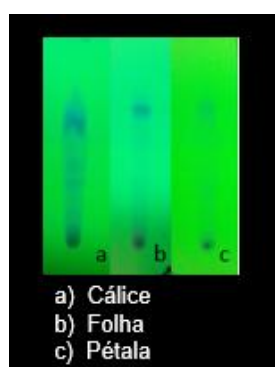
Após a extração ácido/base, a fração diclorometano foi submetida à análise por CCD, utilizando sílica gel como fase estacionária e $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/\text{NH}_4\text{OH}$ (9:1:0,25) como fase móvel. Foram utilizados os reveladores ICIPt e Dragendorff. Segundo a análise por CCD não foi possível observar a presença de alcaloides. Esse fato, aliado ao baixo rendimento das frações (0,39% para os cálices e 0,09% para as folhas) sugere que não foi encontrado a presença de alcaloides nos órgãos avaliados da planta.

A extração ácido/base não foi realizada para as pétalas e sementes devido à pequena quantidade de massa de extrato etanólico obtido.

4.5 DETERMINAÇÃO DO PERFIL CROMATOGRÁFICO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DOS CÁLICES, FOLHAS E PÉTALAS POR CCD

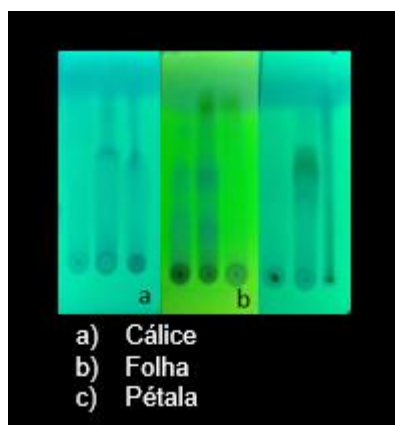
As análises cromatográficas foram realizadas com as frações dos extratos etanólicos dos cálices, folhas e pétalas. Devido a diversidade metabólica presente nas frações foi necessário utilizar dois sistemas de solventes para o desenvolvimento das placas cromatográficas. Para o desenvolvimento das CCD das frações hexano foi utilizado um sistema de solventes que consistiu de Hex/AcOEt (6:4) (Figura 23). Para o desenvolvimento das CCD das frações AcOEt, *n*-BuOH e hidrometanólica foi utilizado AcOEt/HOAc/HCO₂H/H₂O (100:11:11:26), como sistema de solvente (Figura 24).

Figura 23 – CCD das frações hexano, inspeção a 254 nm.



Fonte: Autora, 2015.

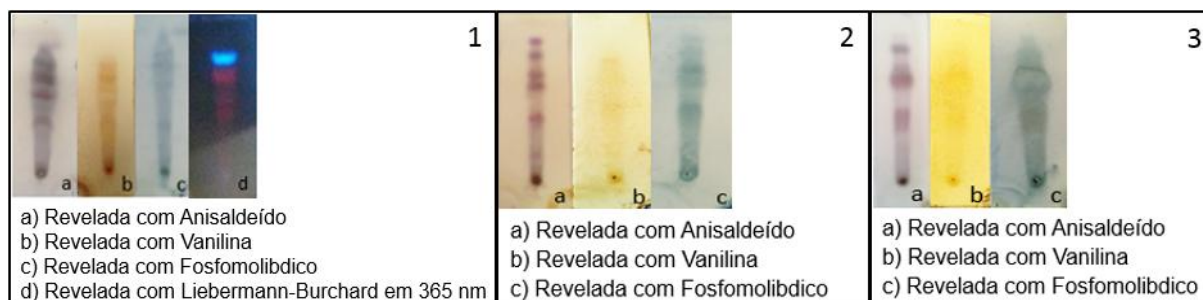
Figura 24 – CCD das frações AcOEt, *n*-BuOH e hidrometanólica, inspeção a 254 nm.



Fonte: Autora, 2015.

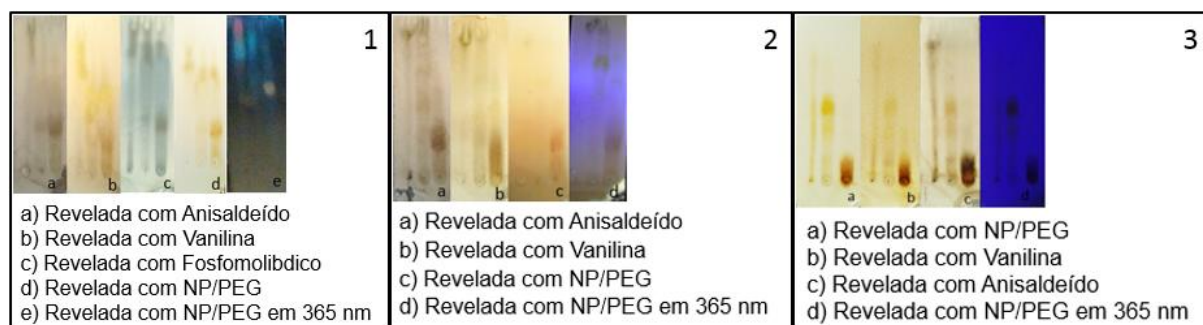
As placas foram reveladas utilizando os reveladores Liebermann-Burchard, NP/PEG, anisaldeído, ácido fosfomolibdico e vanilina sulfúrica (Tabela 4). Além disso, foram observadas sob luz UV a 254 e 365 nm (Figuras 25 e 26) (Tabela 4).

Figura 25 – CCD das frações hexano: Cálices (1), Folhas (2) e Pétalas (3) (FM: Hex/AcOEt (6:4))



Fonte: Autora, 2015.

Figura 26 – CCD das frações AcOEt, *n*-BuOH e hidrometanólica: Cálices (1), Folhas (2) e Pétalas (3) (FM: AcOEt/HOAc/HCO₂H/H₂O (100:11:11:26))



Fonte: Autora, 2015.

Tabela 4 – Prospecção química.

^a MV	Fração	^b Revelador				
		A	B	C	D	E
Cálices	Hexano	+	+	+	+	0
	AcOEt	+	+	+	0	+
	<i>n</i> -BuOH	+	+	+	0	+
	hidrometanólica	+	+	+	0	+
Folhas	Hexano	+	+	+	0	0
	AcOEt	+	0	+	0	-
	<i>n</i> -BuOH	+	0	+	0	+
	hidrometanólica	+	0	+	0	+
Pétalas	Hexano	+	+	+	0	0
	AcOEt	+	0	+	0	+
	<i>n</i> -BuOH	+	0	+	0	+
	hidrometanólica	-	0	-	0	-

^aMV: Material vegetal. ^bReveladores: anisaldeído (A); ácido fosfomolibdico (B); vanilina sulfúrica (C); Liebermann-Burchard (D); NP/PEG (E).

(0): não foi revelada com o revelador; (+): positivo para o revelador; (-): negativo para o revelador

Na prospecção química foi observado o aparecimento de manchas de colorações azul e vermelho na cromatoplaça da fração hexano dos cálices, quando reveladas com o reagente Liebermann-Burchard e submetidas a inspeção em luz UV 365 nm, indicando a presença de terpenos. As cromatoplaças das frações AcOEt e *n*-BuOH dos cálices, folhas e pétalas apresentaram manchas de coloração azul, amarelo e vermelho pela reação do revelador NP/PEG com compostos fenólicos presentes nas frações. As manchas nestas colorações indicam a presença de flavonoides (AZEVEDO et al., 2014).

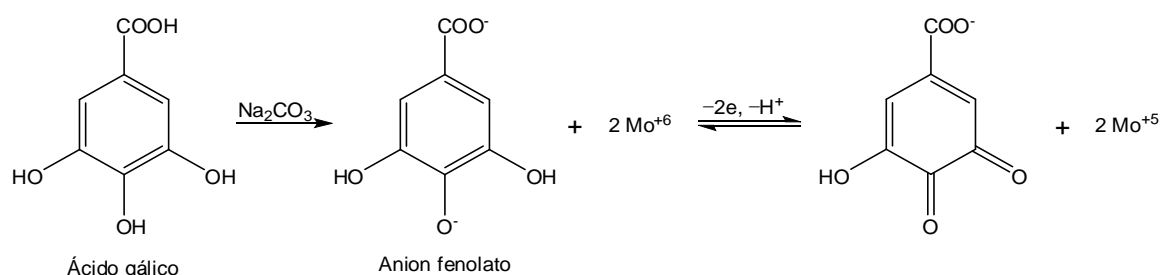
Alguns compostos presentes nas frações hexano, AcOEt e *n*-BuOH dos cálices, folhas e pétalas reagiram com a vanilina sulfúrica levando a manchas com coloração amarelo/alaranjado e, utilizando o ácido fosfomolibdico foi possível observar manchas com coloração azul/esverdeado. Além disso, para as frações hexano dos cálices, folhas e pétalas foi observado o aparecimento de manchas de coloração azul e vermelho e para as frações AcOEt e *n*-BuOH foi observado o aparecimento de manchas de coloração alaranjado nas cromatoplaças quando reveladas com

anisalaldeído. De acordo com a prospecção química, é possível sugerir a presença de esteroides, terpenoides, saponinas, propilpropanoides, fenilpropanoides e flavonoides.

4.6 DETERMINAÇÃO DE FENÓIS TOTAIS PELO MÉTODO DE FOLIN-CIOCALTEAU

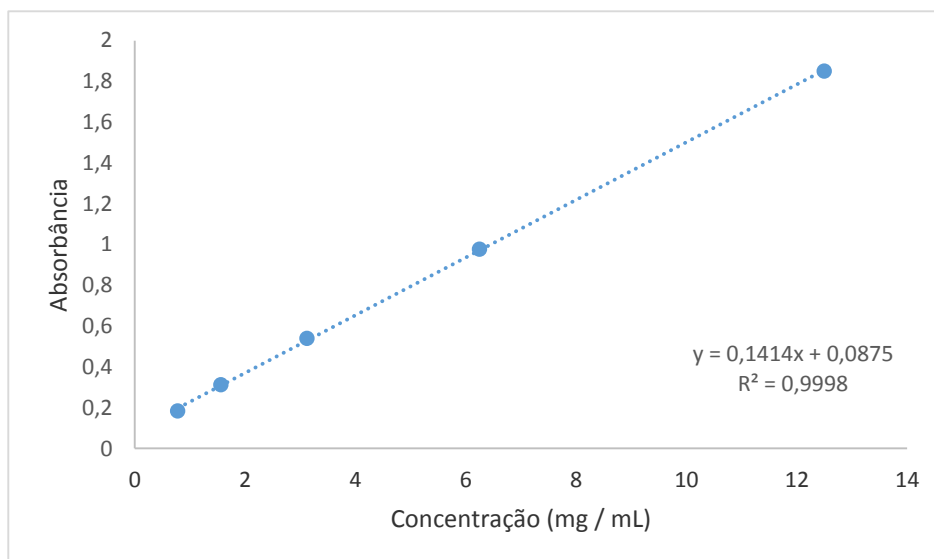
A determinação de fenóis totais (FT) foi realizada pelo método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu, que consiste da mistura dos ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico, onde o molibdênio, que se encontra no estado de oxidação (VI) (de coloração amarela $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), reduz na presença de compostos fenólicos, levando a formação do complexo molibdênio e tungstênio azul $[(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^{4-}]$ cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras (Figura 27) (SINGLETON, ORTHOFER, LAMUELA-RAVENTÓS, 1999 apud OLIVEIRA et al, 2009).

Figura 27 – Reação do ácido gálico com o íon molibdênio



Fonte: Oliveira, 2008.

Para o cálculo de FT foi construído uma curva de calibração do ácido gálico, a partir de concentrações conhecidas, em função da absorbância (Figura 28). A partir da curva de calibração construída, foi calculado o teor de FT, em triplicata, através da interpolação da absorbância dos extratos com as respectivas concentrações. Os resultados foram expressos em miligrama de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra (Tabela 5) (SOUSA et al., 2007; CARVALHO et al., 2012).

Figura 28 – Curva de calibração para o ácido gálico

Fonte: Autora, 2016.

Tabela 5 – Fenóis totais dos extratos e frações de *H. sabdariffa*

Material vegetal	Extrato e frações	mg de EAG / g de amostra (n=3)
Cálices	Extrato etanólico	6,8 ± 0,4
	AcOEt	7,7 ± 0,1
	<i>n</i> -BuOH	5,6 ± 0,6
	Hex	3,1 ± 0,1
	Hidrometanólica	2,1 ± 0,1
Folhas	Extrato etanólico	10,1 ± 0,3
	AcOEt	14,0 ± 1,4
	<i>n</i> -BuOH	23,8 ± 1,4
	Hex	4,1 ± 0,3
	Hidrometanólica	7,7 ± 0,6
Pétalas	Extrato etanólico	8,1 ± 0,3
	AcOEt	30,7 ± 1,7
	<i>n</i> -BuOH	61,5 ± 2,8
	Hex	4,7 ± 0,2
	Hidrometanólica	3,1 ± 0,2
Sementes	Extrato etanólico	10,4 ± 1,3

Na Tabela 5 é possível observar que a fração *n*-BuOH das pétalas apresentou maior quantidade de fenóis, (61,5 ± 2,8 mg EAG/g), seguida da fração AcOEt (30,7 ± 1,7 mg EAG/g). Depois das pétalas, o órgão que apresentou maior teor de fenóis foi as folhas sendo a fração *n*-BuOH (23,8 ± 1,4 mg EAG/g) a de maior quantidade de fenóis,

seguida da fração AcOEt ($14,0 \pm 1,4$ mg EAG/g), enquanto que a fração hidrometanólica dos cálices apresentou o menor teor de fenóis ($2,1 \pm 0,1$ mg EAG/g).

A fração hidrometanólica das folhas ($7,7 \pm 0,6$ mg EAG/g), AcOEt ($7,7 \pm 0,1$ mg EAG/g), o extrato etanólico ($6,8 \pm 0,4$ mg EAG/g), e a fração n-BuOH ($5,6 \pm 0,6$ mg EAG/g) dos cálices foram os que tiveram menores quantidades de fenóis, seguidos das frações hexânicas das pétalas ($4,7 \pm 0,2$ mg EAG/g), das folhas ($4,1 \pm 0,3$ mg EAG/g), dos cálices ($3,1 \pm 0,1$ mg EAG/g) e as frações hidrometanólicas das pétalas ($3,1 \pm 0,2$ mg EAG/g) e dos cálices ($2,1 \pm 0,1$ mg EAG/g).

Mohd-Esa e colaboradores (2010) encontraram maior quantidade de fenóis totais nas sementes em extrato metanólico ($4,87 \pm 0,14$ mg EAG/g) quando comparado com extrato destilado com água ($2,97 \pm 0,17$ mg EAG/g). Nos cálices, encontraram no extrato metanólico ($2,91 \pm 0,07$ mg EAG/g) e em extrato destilado com água ($1,85 \pm 0,11$ mg EAG/g). E, para os extratos metanólico e destilado com água ($2,20 \pm 0,02$ mg EAG/g) e ($1,71 \pm 0,04$ mg EAG/g), respectivamente (MOHD-ESA et al., 2010). No presente estudo, os extratos etanólicos também apresentaram maior teor de fenóis em sementes ($10,4 \pm 1,3$ mg EAG/g) porém, seguido das folhas ($10,1 \pm 0,3$ mg EAG/g) e dos cálices ($6,8 \pm 0,4$ mg EAG/g), contudo os resultados foram maiores em extrações com etanol.

Carvalho et al, 2012 também encontrou maior teor fenólicos no extrato etanólico das folhas ($108,39$ µg EAG/mL) quando comparado com o extrato etanólico dos cálices ($19,24$ µg EAG/mL) (CARVALHO et al., 2012).

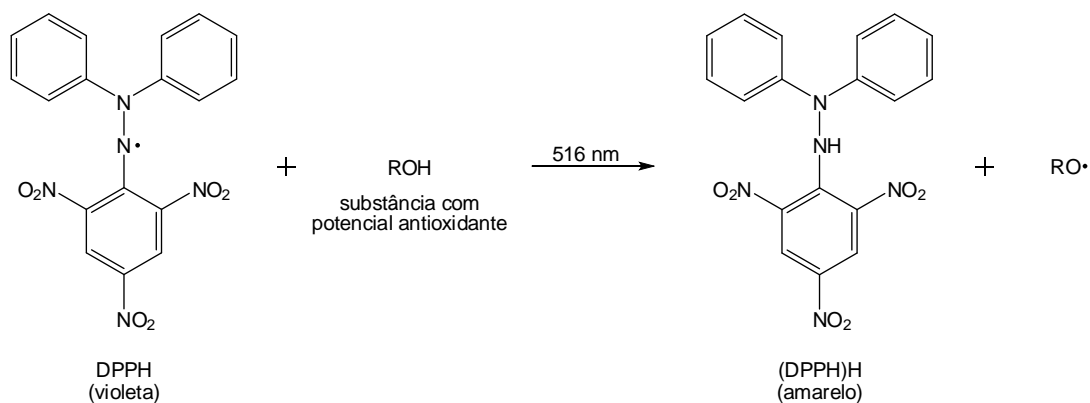
Estudos anteriores demonstraram que o estágio de desenvolvimento da planta pode interferir nas vias biosintéticas de compostos fenólicos. Além disso, o teor de fenóis pode variar em diferentes solventes de extração (MOHD-ESA et al., 2010).

4.7 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO RADICAL DPPH

O potencial antioxidante de uma substância está relacionado com a capacidade deste composto em ceder um hidrogênio através de uma reação radicalar para o radical livre 2,2-difenil-picrilhidrazila (DPPH) (violeta) que absorve luz UV a 516 nm. Depois que o radical DPPH for reduzido, o produto desta reação 2,2-difenil-picrilhidrazina (amarelo), deixa de absorver luz a 516 nm, conseqüentemente há um

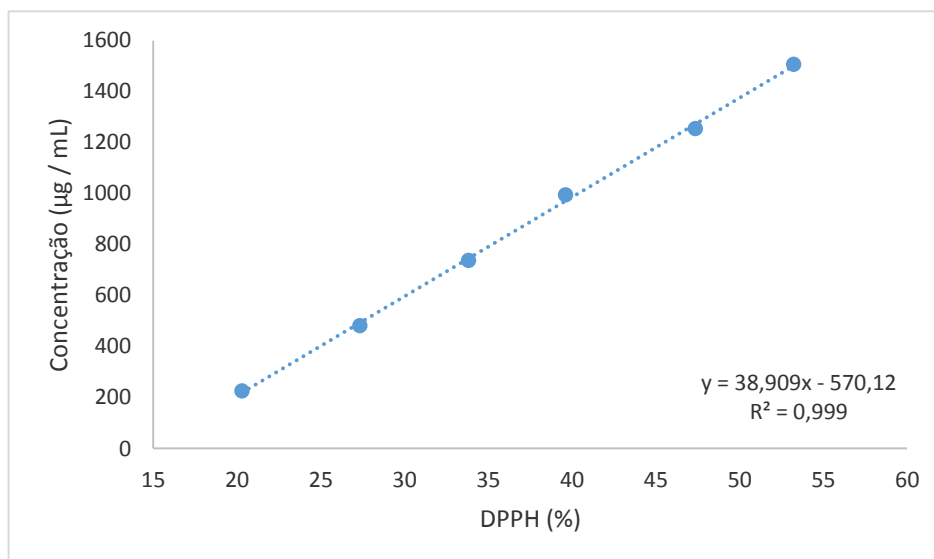
decréscimo da absorbância (Figura 29) (BERSET; CUVELIER; BRAND-WILLIAMS, 1995).

Figura 29 – Reação de redução do radical DPPH

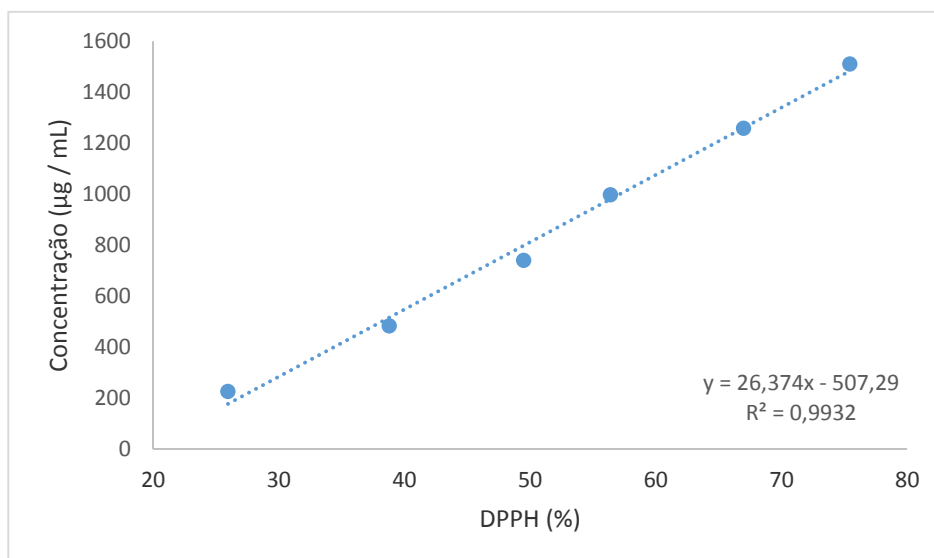


Fonte: Autora, 2016.

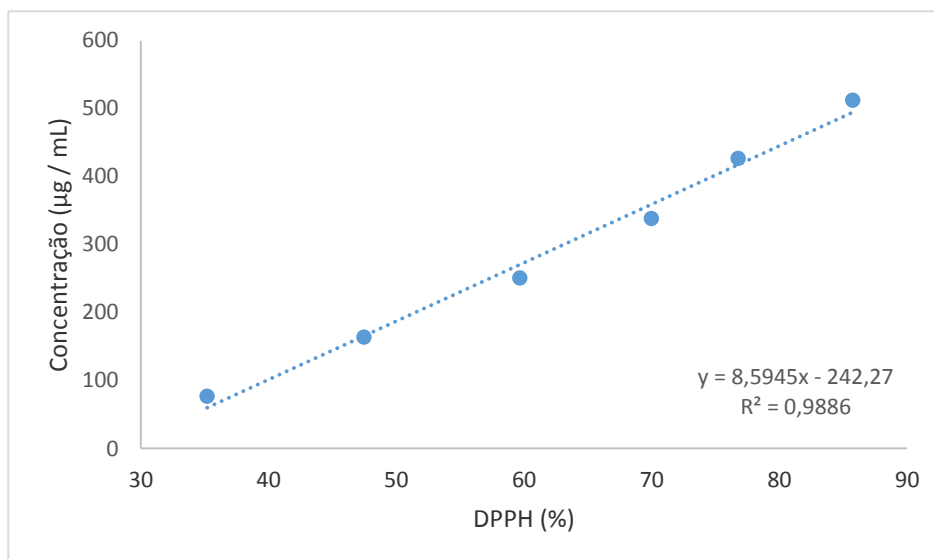
A concentração efetiva média (CE_{50}), que representa a concentração de amostra necessária para consumir 50% do radical DPPH, foi calculada plotando-se a porcentagem de radical DPPH consumido *versus* as concentrações dos extratos de cada amostra expresso em $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Figuras 30–38) (Tabela 6). Um valor de CE_{50} baixo indica que a amostra apresenta maior atividade antioxidante, sendo que o CE_{50} inferior a $50\ \mu\text{g mL}^{-1}$ é considerado muito ativo; entre 50 e $100\ \mu\text{g mL}^{-1}$ é moderado; entre 100 e $200\ \mu\text{g mL}^{-1}$ é pouco ativo, e acima de $200\ \mu\text{g mL}^{-1}$ é inativo (REYNERTSON; BASILE; KENNELLY, 2005).

Figura 30 – Consumo do DPPH do Extrato etanólico dos cálices

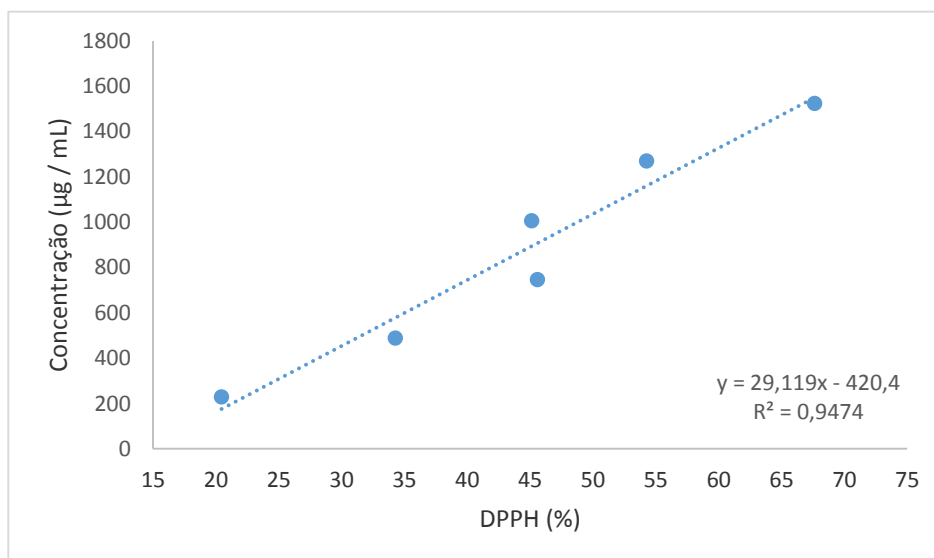
Fonte: Autora, 2016.

Figura 31 – Consumo do DPPH do Extrato etanólico das folhas

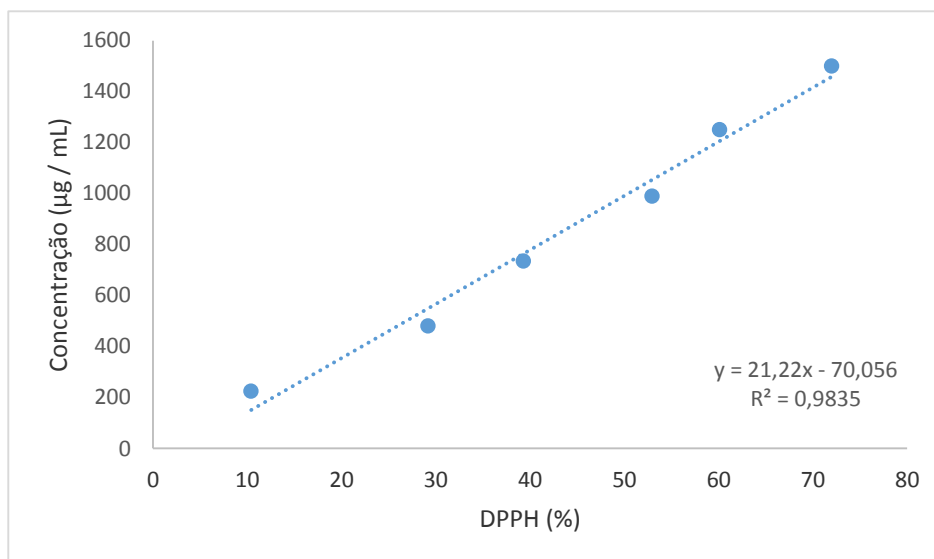
Fonte: Autora, 2016.

Figura 32 – Consumo do DPPH do Extrato etanólico das pétalas

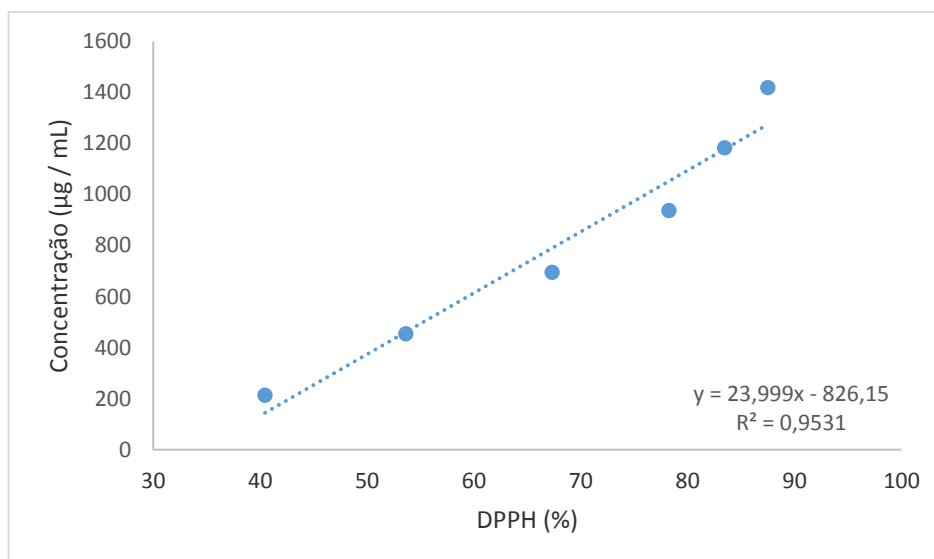
Fonte: Autora, 2016.

Figura 33 – Consumo do DPPH da fração AcOEt dos cálices

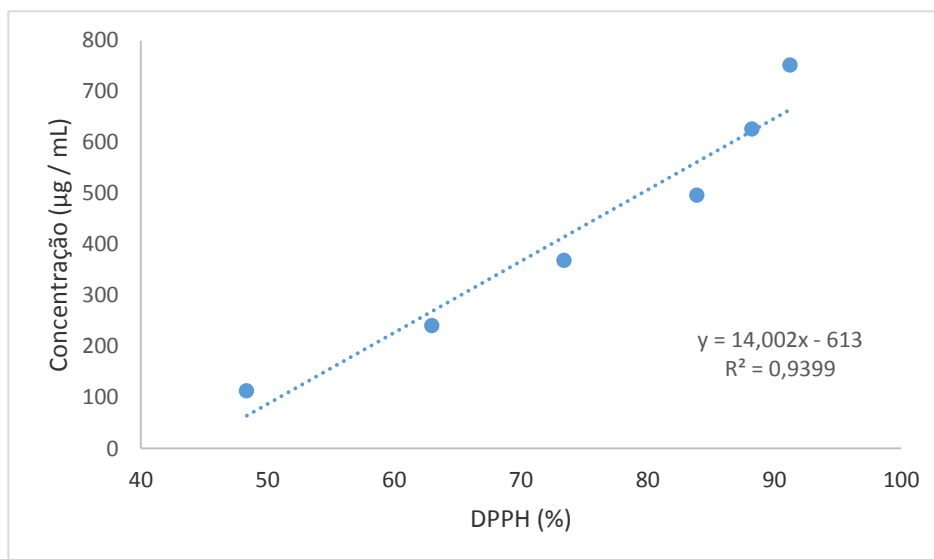
Fonte: Autora, 2016.

Figura 34 – Consumo do DPPH da fração *n*-BuOH dos cálices

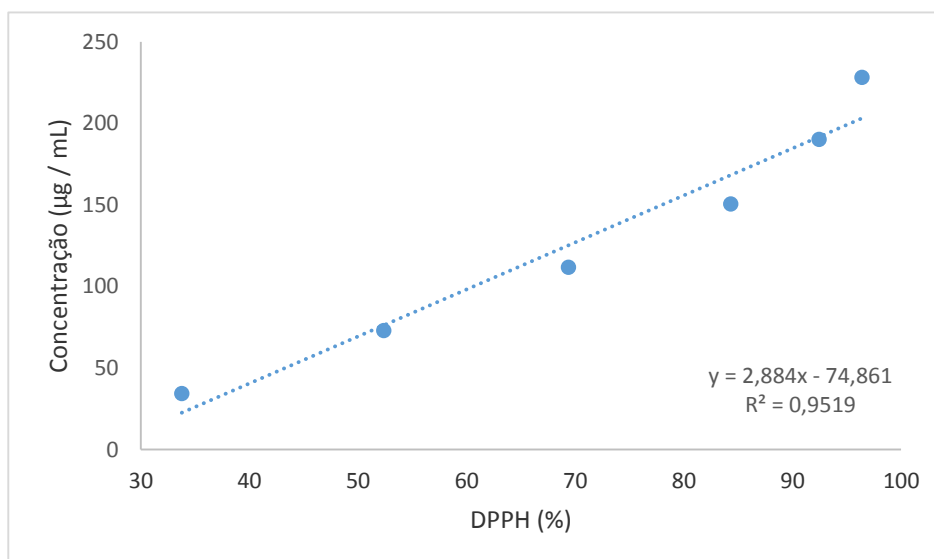
Fonte: Autora, 2016.

Figura 35 – Consumo do DPPH da fração AcOEt das folhas

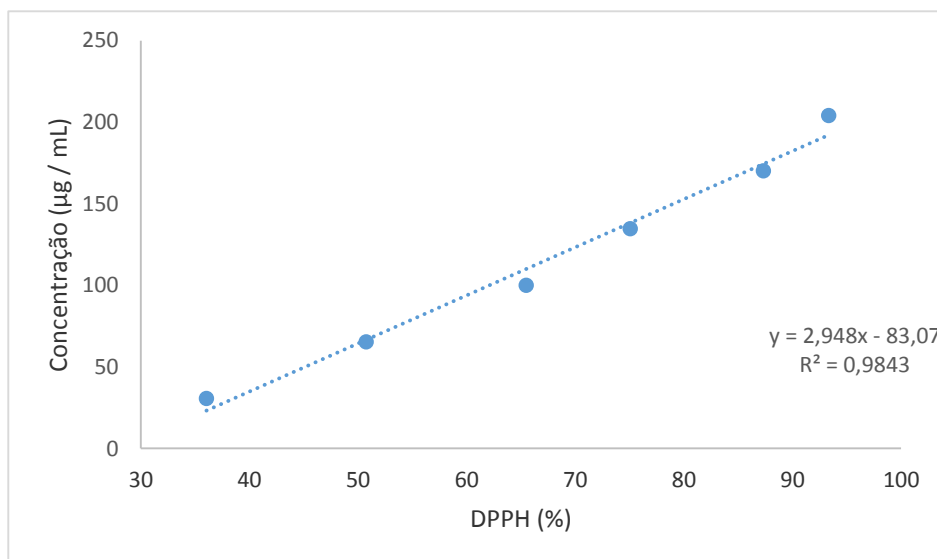
Fonte: Autora, 2016.

Figura 36 – Consumo do DPPH da fração *n*-BuOH das folhas

Fonte: Autora, 2016.

Figura 37 – Consumo do DPPH da fração AcOEt das pétalas

Fonte: Autora, 2016.

Figura 38 – Consumo do DPPH da fração *n*-BuOH das pétalas

Fonte: Autora, 2016.

Tabela 6 – Potencial antioxidante dos extratos e frações de *H. sabdariffa*

Material vegetal	Extrato e frações	CE ₅₀ (µg mL ⁻¹) (n=3)
Cálices	Extrato etanólico	1375,3 ± 72,2
	AcOEt	1035,6 ± 66,2
	<i>n</i> -BuOH	990,9 ± 21,1
	Hex	> 5000
	Hidrometanólica	> 5000
Folhas	Extrato etanólico	811,4 ± 13,0
	AcOEt	373,8 ± 34,4
	<i>n</i> -BuOH	87,1 ± 15,6
	Hex	> 5000
	Hidrometanólica	> 5000
Pétalas	Extrato etanólico	187,5 ± 11,5
	AcOEt	69,3 ± 8,2
	<i>n</i> -BuOH	64,3 ± 6,2
	Hex	> 5000
	Hidrometanólica	> 5000
Sementes	Extrato etanólico	> 5000

As frações mais ativas foram *n*-butanol e acetato de etila das pétalas e *n*-butanol das folhas (64,3 ± 6,2, 69,3 ± 8,2 e 87,1 ± 15,6 µg mL⁻¹, respectivamente). Estes valores são considerados moderados para extratos e frações (REYNERTSON;

BASILE; KENNELLY, 2005), no entanto, o foco desse trabalho foi os extratos e frações que possuem diversos metabólitos, sendo que nem todos foram ativos. Como esperado, as frações que apresentaram menores valores de fenóis totais não apresentaram atividade antioxidante (frações hexânicas e hidrometanólicas dos cálices, folhas e pétalas; e do extrato etanólico das sementes).

Os valores de fenóis totais corroboram estes resultados, pois as amostras com maior potencial antioxidante foram aquelas com maior teor fenólico. Esta relação se aplica porque os compostos fenólicos quando formam um radical, podem deslocalizar o elétron desemparelhado por ressonância conferindo estabilidade a esta espécie química.

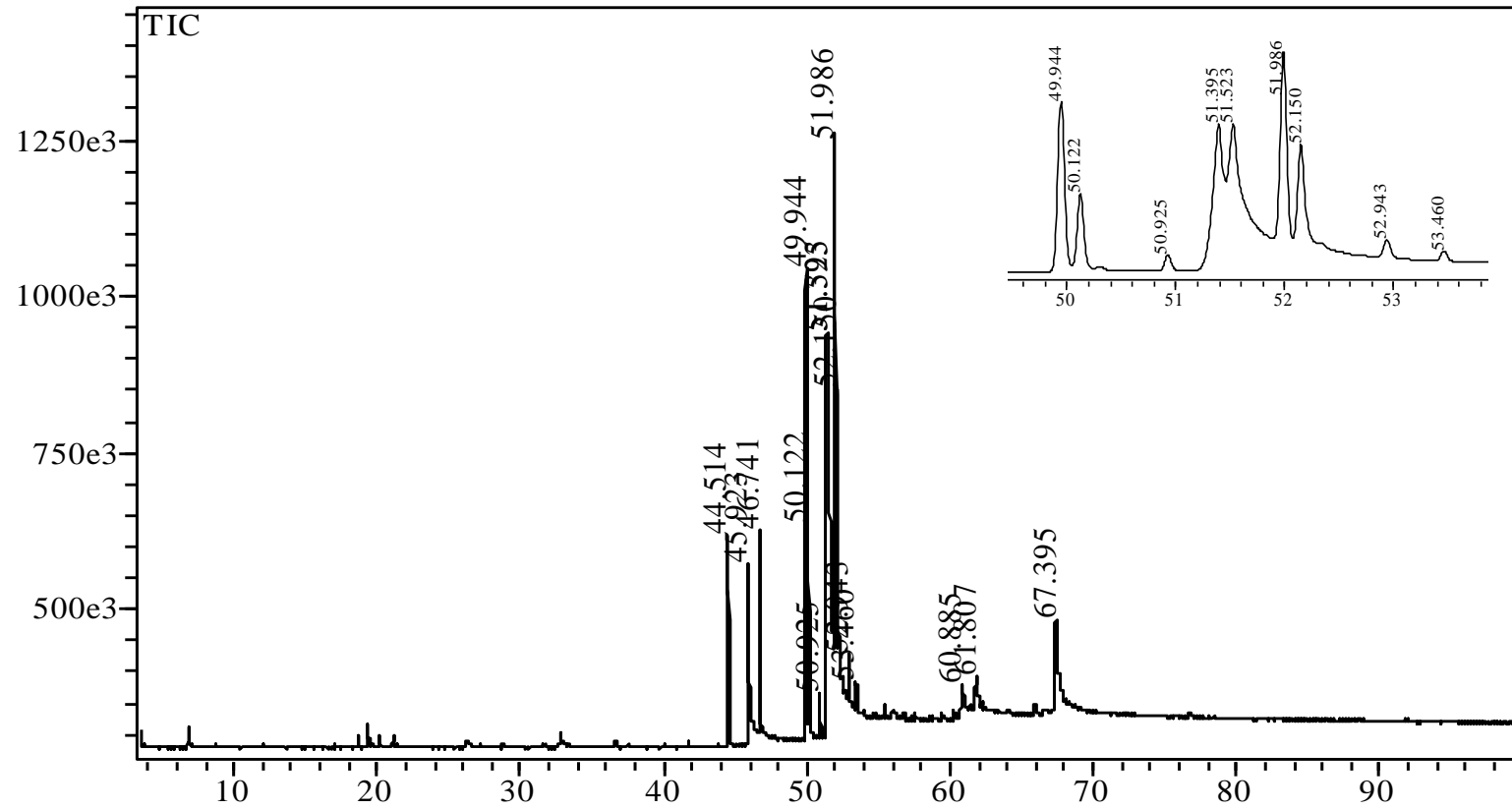
Em estudos com extratos aquoso das folhas e cálices, com leitura feita após 30 minutos da introdução da amostra, foi encontrado maior potencial antioxidante nas folhas (90,42 %) seguido dos cálices (65,95 %) (CARVALHO, et al., 2012). Assim como encontrado, no presente estudo, com os extratos etanólicos das folhas e cálices.

4.8 ANÁLISE POR CG-EM DO EXTRATO ETANÓLICO DAS SEMENTES DE *H. sabdariffa*.

O extrato etanólico das sementes foi obtido como um óleo de cor amarelo-esverdeado (MOHAMED et al., 2007). Por apresentar este aspecto oleoso foi submetido à análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, onde foi possível observar a presença de 15 sinais (Figura 39).

A partir da análise dos espectros de massas comparados com aqueles das bibliotecas (NIST e Adams) e índice aritmético, foram propostas estruturas para as substâncias presentes nesta matriz. Na análise dos espectros de massas foram identificados 11 compostos sendo dois com similaridade abaixo de 90% (Tabela 7). Na Tabela 7 estão descritos os tempos de retenção (t_R), índices aritméticos (AI) (experimental e teórico), porcentagem de similaridade e estruturas propostas.

Figura 39 – Cromatograma de íons totais do EE-Se de *H. sabdariffa*.



Fonte: Autora, 2016.

Tabela 7 – Substâncias propostas a partir da análise por CG-EM do EE-Se de *H. sabdariffa*.

t_R (min)	Substâncias propostas	AI calculado	AI teórico	Similaridade/EM (%)
44,5	hexadecanoato de metila	1927	1921	90
45,9	ácido hexadecanóico (ácido palmítico)	1934	1959	92
46,7	hexadecanoato de etila	1946	1992	91
49,9	octadeca-9,12-dienoato de metila (linoleato de metila)	2047	2095	94
50,1	9-octadecenoato de metila (elaidato de metila)	2050	ni	91
50,9	octadecanoato de metila (estearato de metila)	2124	2124	84
51,4	ácido octadeca-9,12-dienoico (ácido linoleico)	2140	2132	91
51,5	ácido octadeca-9,12-dienoico (ácido linoleico)	2143	2132	91
52,0	octadeca-9,12-dienoato de etila (linoleato de etila)	2159	2177	92
52,2	9-octadecenoato de etila (oleato de etila)	2164	2180	90
52,9	octadecanoato de etila (estearato de etila)	2191	2196	80
53,5	Ni	-	-	-
60,9	Ni	-	-	-
61,8	Ni	-	-	-
67,4	Ni	-	-	-

ni - não identificado;

No extrato etanólico das sementes foram identificados ésteres e ácidos carboxílicos de cadeia longa. Foi possível observar que o sinal referente ao íon molecular dos ésteres de metila de ácidos alifáticos lineares foi quase sempre

observado. Em geral, os sinais dos íons moleculares dos ésteres de metila são pouco intensos para massas de m/z 130 a 200 u . São mais intensos à medida que o tamanho da cadeia aumenta (maiores que m/z 200 u). Dentre os fragmentos mais intensos e frequentes está o sinal de m/z 74, que pode ser atribuído ao rearranjo do tipo McLafferty, através da clivagem da ligação entre o carbono β e a carbonila. Também são frequentes os sinais referentes aos íons moleculares (M^{+}), íon acílio (RCO^{+}) e uma série de sinais com diferenças de 28 u , que pode ser correlacionado a eliminações de grupos C_2H_4 (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010).

A partir das análises dos dados de AI teórico e experimental, aliados aos dados dos EM dos compostos identificados nas análises por CG-EM, foi possível atribuir uma série de ácidos graxos de cadeias extensas saturadas e insaturadas (Figuras 40–51).

Para o composto referente ao t_R 44,5 min (Figura 40), o EM apresentou um sinal referente ao íon molecular de m/z 270, que foi atribuído ao hexadecanoato de metila. A proposta de fragmentação (Figura 41) apresenta como pico base o sinal de m/z 74, que foi atribuído ao rearranjo do tipo McLafferty. Na sequência a eliminação da metoxila leva a formação do íon acílio de m/z 43. Também foram observados fragmentos referentes a eliminações de grupos alquilas, como o sinal de m/z 227, atribuído à eliminação de um grupo propila (43 u) e, na sequência, sinais referentes a eliminações consecutivas de etenos (28 u) até m/z 87, característicos de compostos alifáticos de cadeias longas não ramificadas (PAVIA et al., 2010).

Figura 40 – EM-IE do composto referente ao t_R 44,5 min.

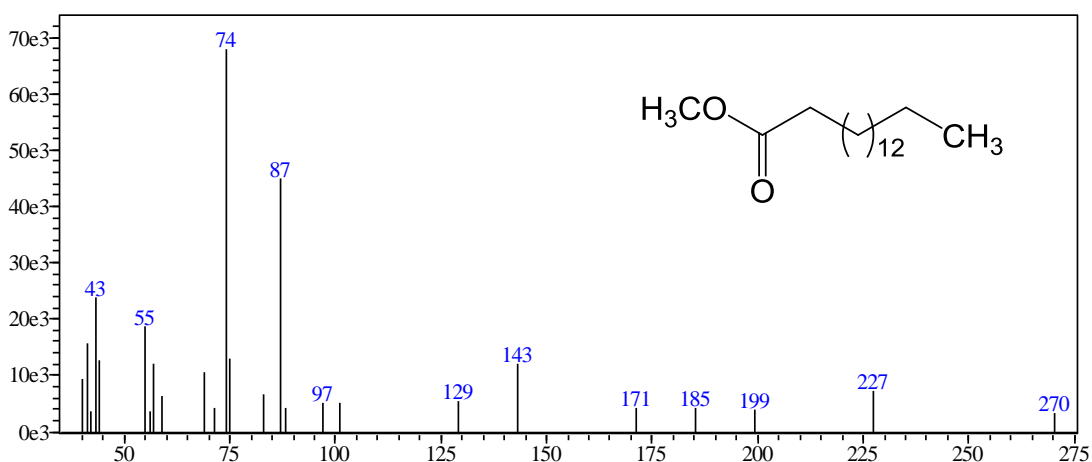
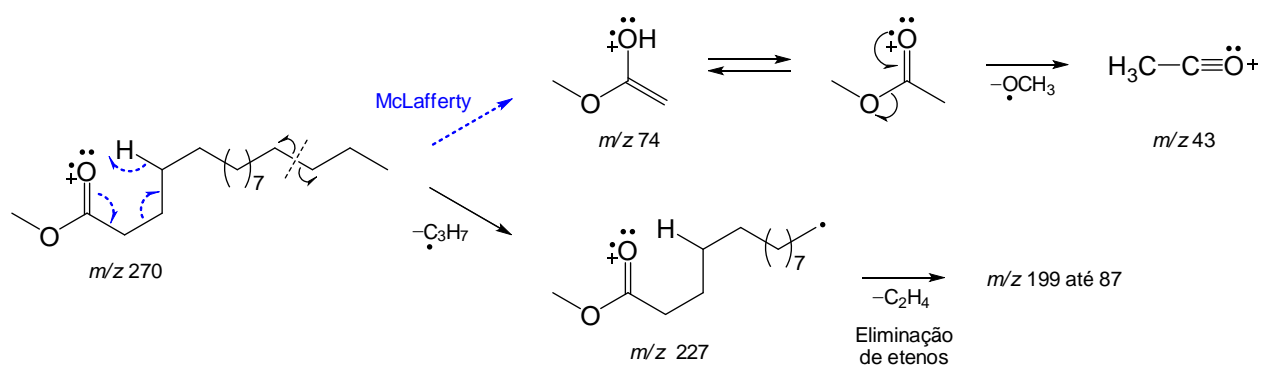


Figura 41 – Proposta de fragmentação para o composto referente ao t_R 44,5 min.



Na análise do EM do composto referente ao t_R 46,7 min (Figura 42), foi observado o sinal referente ao íon molecular em m/z 284, que foi atribuído ao hexadecanoato de etila. Este composto apresenta sinal (m/z 88) referente ao rearranjo do tipo McLafferty, similar aquele discutido para o composto de t_R 44,5 min (Figura 41), porém com uma diferença de 14 u atribuída a presença da etila no final da cadeia.

O composto de t_R 50,9 min (Figura 43), cujo sinal referente ao íon molecular foi observado em m/z 298, foi correlacionado ao octadecanoato de metila que também é um éster saturado e difere do composto de t_R 44,5 min por duas unidades metileno (CH_2) na extensão da cadeia linear. No EM também foi observado um sinal (m/z 74) referente a clivagem do tipo MacLafferty, similar àquela discutida para o composto de t_R 44,5 min (Figura 41).

O composto de t_R 52,9 min (Figura 44), cujo sinal referente ao íon molecular foi observado em m/z 312, foi correlacionado ao octadecanoato de etila, que assim como o composto de t_R 46,7 min, apresenta um sinal em m/z 88, atribuído ao rearranjo do tipo MacLafferty. Além deste sinal, é possível observar similaridade no perfil dos EM destes compostos.

Figura 42 – EM-IE do composto referente ao t_R 46,7 min.

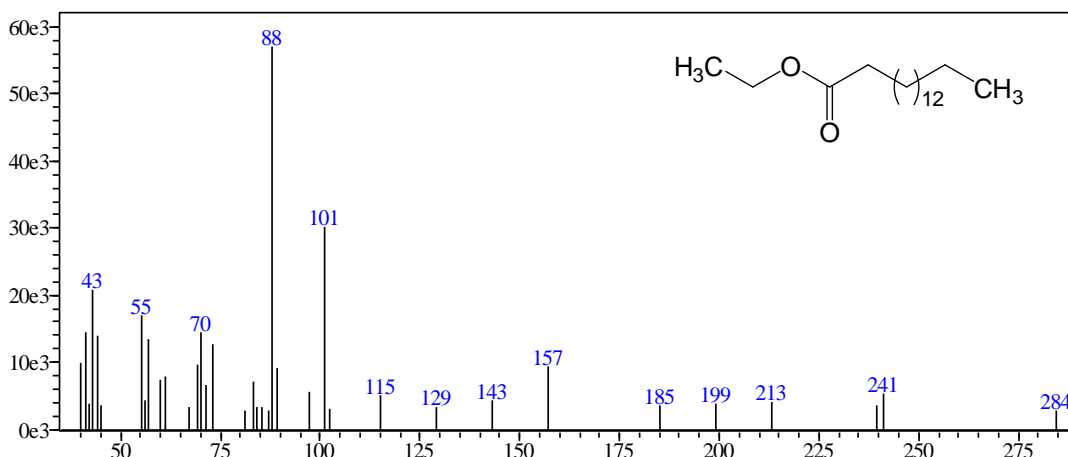


Figura 43 – EM-IE do composto referente ao t_R 50,9 min

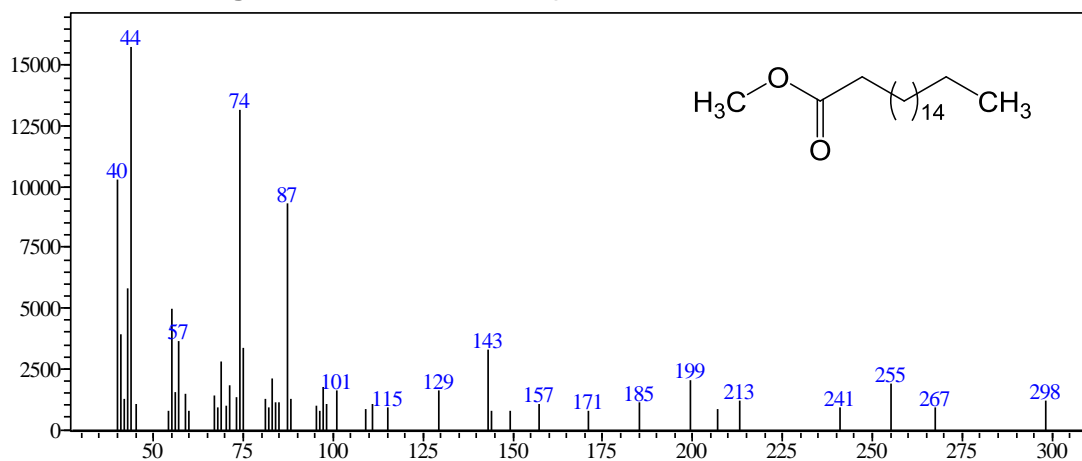
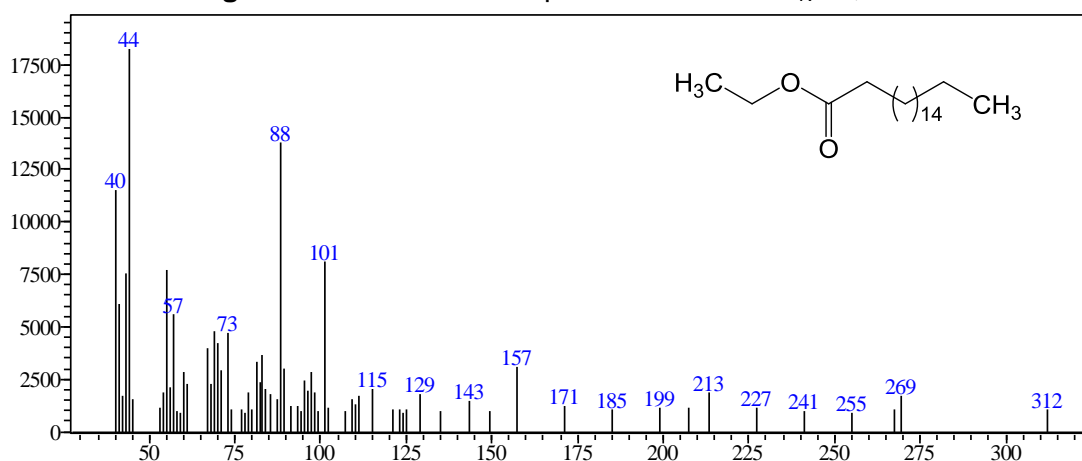


Figura 44 – EM-IE do composto referente ao t_R 52,9 min.



O composto de t_R 49,9 min (Figura 45), cujo sinal referente ao íon molecular foi observado em m/z 294, foi correlacionado ao octadeca-9,12-dienoato de metila, que é um éster insaturado. É possível observar no EM que o sinal de m/z 74, característico

do rearranjo de MacLafferty, tem baixa intensidade, sendo o sinal de m/z 67 o pico base. Este fato deve estar associado à presença da instauração na cadeia lateral, modificando o perfil de fragmentação.

Características semelhantes às do composto de t_R 49,9 min (Figura 45), são observadas para o composto de t_R 50,1 min (Figura 46), que também apresenta insaturação, sendo observado o sinal de m/z 55 como pico base. De acordo com a similaridade das bibliotecas NIST e Adamns este composto seria o 9-octadecenoato de metila.

Figura 45 – EM-IE do composto referente ao t_R 49,9 min

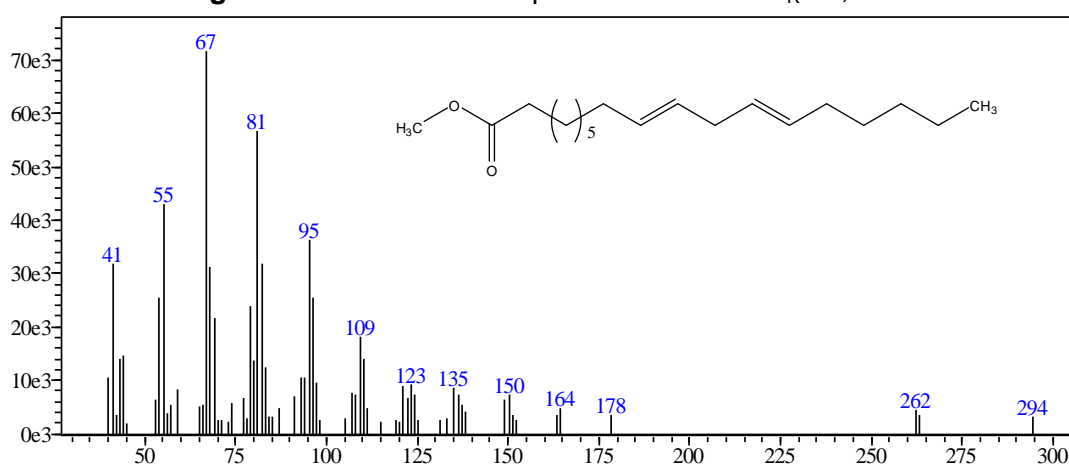
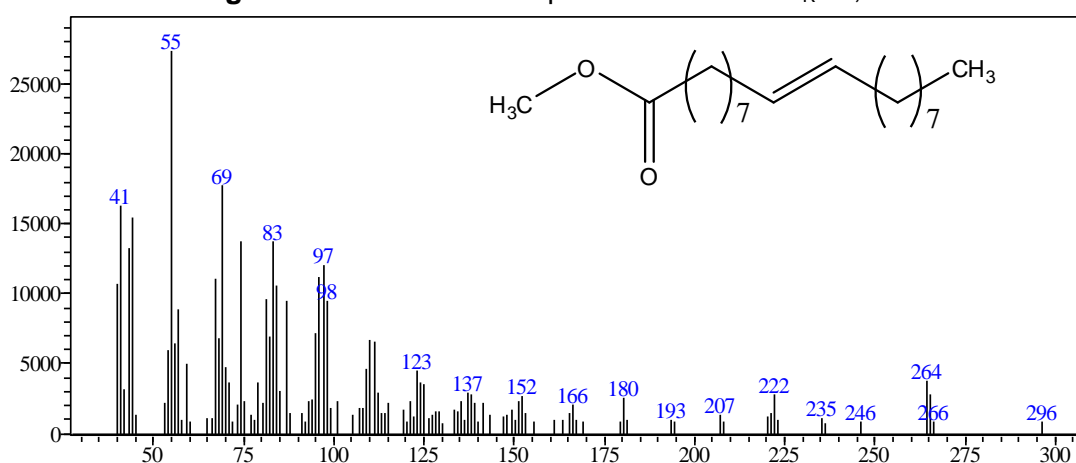


Figura 46 – EM-IE do composto referente ao t_R 50,1 min



Características semelhantes às dos compostos de t_R 49,9 min (Figura 45) e t_R 50,1 min (Figura 46), são observadas para os compostos de t_R 52,0 min (Figura 47) e t_R 52,2 min (Figura 48), respectivamente, que também apresentam insaturações, sendo observados os sinais de m/z 67 e 55 como picos base, respectivamente. De acordo com a similaridade das bibliotecas NIST e Adamns estes compostos seriam o octadeca-9,12-dienoato de etila e 9-octadecenoato de etila

Figura 47 – EM-IE do composto referente ao t_R 52,0 min

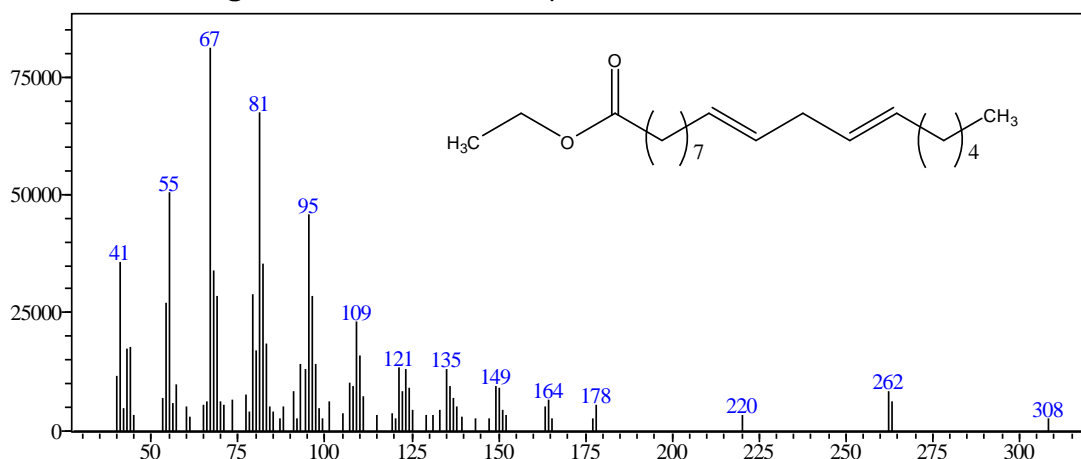
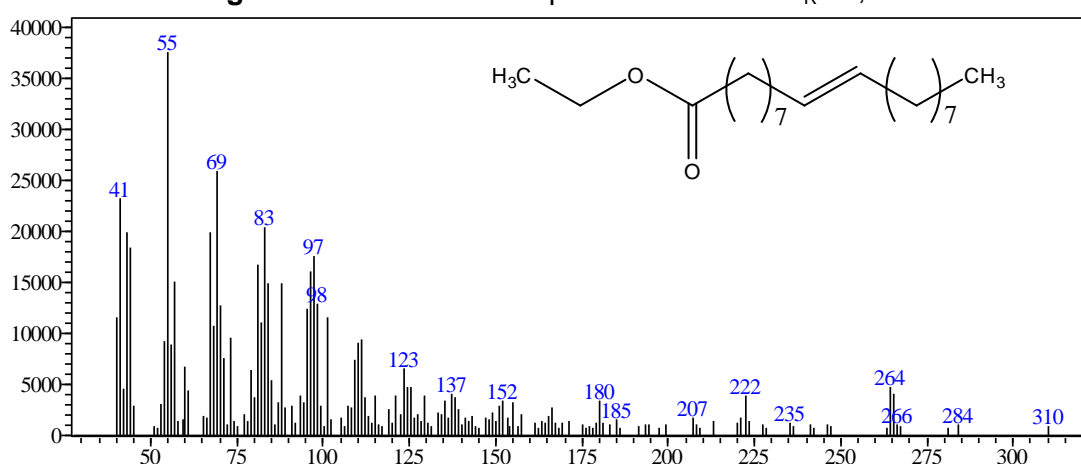


Figura 48 – EM-IE do composto referente ao t_R 52,2 min



Os espectros de massas e as estruturas dos ácidos carboxílicos com identificação proposta por CG-EM da amostra e suas respectivas estruturas são apresentados nas Figuras 49–51.

O EM do composto referente ao t_R 45,9 min (Figura 49), apresentou um sinal referente ao íon molecular em m/z 256, que foi atribuído ao ácido hexadecanóico (ácido palmítico). A proposta de fragmentação (Figura 50) apresenta um sinal de m/z 60, que foi atribuído ao rearranjo do tipo McLafferty. Na sequência a eliminação da hidroxila leva a formação do íon acílio de m/z 43. Também foram observados fragmentos referentes a eliminações de grupos alquilas, como o sinal de m/z 227, atribuído à eliminação de um grupo etila (29 u) e, na sequência, eliminações consecutivas de etenos (28 u) até a formação do pico base em m/z 87. Este padrão é característico de compostos alifáticos de cadeias extensas não ramificadas (PAVIA et al., 2010; SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2010).

Figura 49 – EM-IE do composto referente ao t_R 45,9 min

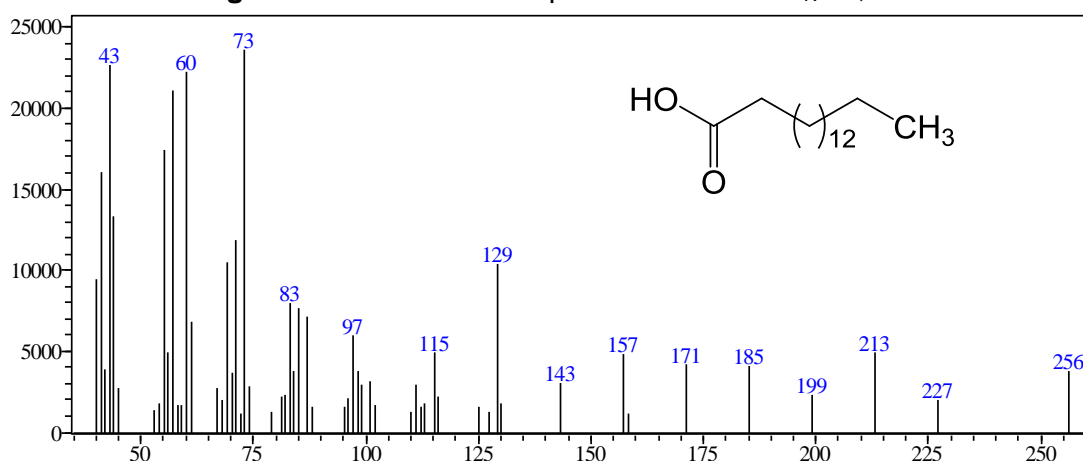
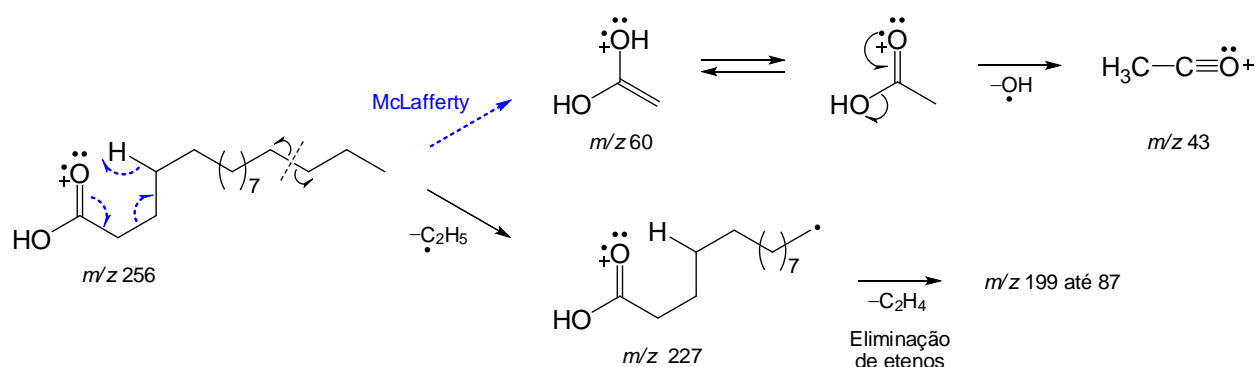
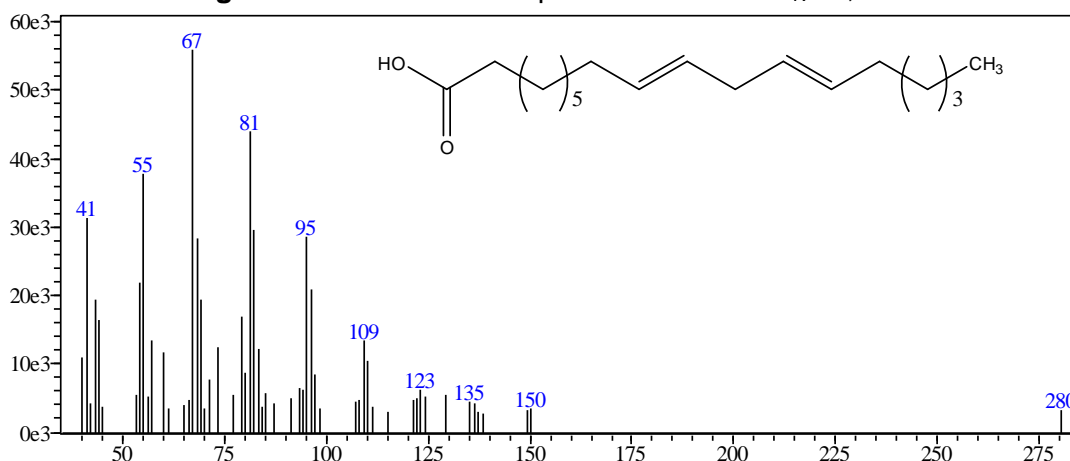


Figura 50 – Proposta de fragmentação para o composto referente ao t_R 45,9 min.



O EM do composto de t_R 51,4 min (Figura 51) apresentou características semelhantes às dos compostos de t_R 49,9 min (Figura 45) e t_R 52,0 min (Figura 47), que são ésteres insaturados. De acordo com a similaridade das bibliotecas NIST e Adamns este composto seria o ácido octadeca-9,12-dienoico (ácido linoleico), o que corrobora com estudos anteriores que descrevem a presença deste ácido no óleo de *H. sabdariffa*, como sendo o composto mais abundante, seguido pelo ácido palmítico (ácido hexadecanoico).

O ácido graxo linoleico-oleico é importante nas indústrias alimentícias como na produção de manteigas através de processos de hidrogenação (MOHAMED et al., 2007).

Figura 51 – EM-IE do composto referente ao t_R 51,4 min

O composto de t_R 51,5 min apresentou o mesmo índice aritmético e mesma similaridade do octadeca-9,12-dienoico (Figura 51), portanto o mesmo espectro. De acordo com estes dados sugerimos que este composto seja um estereoisômeros do tipo *E* e *Z* do composto de t_R 51,4 min.

Os sinais de tempo de retenção 53,5; 60,9; 61,8 e 67,4 min não foram identificados, sugerindo assim que podem ser novos compostos.

4.9 ENSAIOS LEISHMANICIDA E DE CITOTOXICIDADE

Em 2011, foram divulgados dados etnofarmacológicos relacionados à utilização de plantas para tratamento da leishmaniose cutânea na Guiana Francesa, onde há uma alta incidência dessa patologia. Relatos indicam que as folhas e caules de *H. sabdariffa* são utilizados na forma de suco como forma alternativa para a profilaxia da doença (ODONNE et al., 2011). Neste sentido, os extratos etanólicos e frações dos cálices, pétalas e folhas de *H. sabdariffa* foram avaliados no ensaio leishmanicida e de citotoxicidade.

A partir da análise dos resultados dos extratos etanólicos (EE) e das frações no ensaio de atividade leishmanicida (Tabela 8), foi possível observar que as frações *n*-hexano de todos os órgãos, foram as que apresentaram melhores resultados, com valores de CI_{50} de 83 ± 16 (pétalas), 40 ± 8 (folhas) e 67 ± 8 (cálices), pois os menores valores de CI_{50} são os que apresentam maior atividade.

Para extratos e frações um valor de CI_{50} menor que $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ é considerado altamente ativo; valores entre 10 e $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ é ativo; entre 50 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ é

moderadamente ativo, e CI_{50} maiores que $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ é considerado não ativo (OZORIO et al., 2007).

No presente trabalho a fração *n*-hexano das folhas teve a melhor resposta contra o parasita ($40 \pm 8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e apresentou uma atividade considerada ativa. Além disso, as frações *n*-hexano, AcOEt das pétalas e cálices e *n*-BuOH das folhas apresentaram uma atividade moderadamente ativa. Enquanto que os extratos etanólicos, a fração AcOEt das folhas, *n*-BuOH dos cálices e pétalas; e as frações hidrometanólicas não apresentaram atividade.

A partir dos ensaios *in vitro* e resultados da concentração citotóxica das células e da capacidade de inibição de 50% dos parasitas foi possível calcular o índice de seletividade (IS).

Case et al (2006), descrevem como calcular o IS como sendo o logaritmo da razão entre a citotoxicidade das células analisadas pela concentração inibitória dos parasitas. O valor obtido está associado à seletividade da amostra contra o organismo em relação às células Vero.

Valores de CC_{50} menores que $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ é considerado altamente tóxico, valores entre 10 e $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ é tóxico, entre 100 e 1000 é moderadamente tóxico e valores de CC_{50} acima de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ é considerado não tóxico (OZORIO et al., 2007).

No presente trabalho o fato da fração mais ativa ser das folhas está de acordo com os dados etnofarmacológicos descritos para a planta, citado pela comunidade de Wayãpi no uso das folhas como remédios tópicos no tratamento da leishmaniose (ODONNE et al., 2011).

Tabela 8 - Ensaio de atividade leishmanicida com *L. amazonensis*.

Órgão	Amostra	CI ₅₀ ^a (µg mL ⁻¹) <i>L. amazonensis</i>	CC ₅₀ ^b (µg mL ⁻¹) Células Vero	IS ^c
Pétalas	EE-Pe	358 ± 6	> 512	–
	F. <i>n</i> -hexano	83 ± 16	384 ± 15	0,66
	F. AcOEt	93 ± 6	187 ± 14	0,30
	F. <i>n</i> -BuOH	> 512	> 512	–
	F. hidro-MeOH	> 512	> 512	–
Folhas	EE-Fo	209 ± 8	389 ± 9	0,27
	F. <i>n</i> -hexano	40 ± 8	94 ± 4	0,37
	F. AcOEt	120 ± 19	197 ± 12	0,21
	F. <i>n</i> -BuOH	92 ± 7	> 512	–
	F. hidro-MeOH	> 512	> 512	–
Cálices	EE-Ca	> 512	> 512	–
	F. <i>n</i> -hexano	67 ± 8	96 ± 9	0,16
	F. AcOEt	88 ± 9	270 ± 19	0,49
	F. <i>n</i> -BuOH	> 512	> 512	–
	F. hidro-MeOH	> 512	> 512	–
Controle positivo	Anfotericina B	0,29 ± 0,01	–	–

^aCI₅₀ concentração da amostra que causa 50% da inibição do parasita. ^bCC₅₀ concentração da amostra na qual 50% das células são viáveis. ^cIS = log[CC₅₀ (células Vero)/CI₅₀ (*L. amazonensis*)] (CASE et al., 2006).

5 CONCLUSÕES

1) O acompanhamento do crescimento da planta permitiu a autenticação e coleta dos diferentes órgãos da espécie.

2) A extração líquido-líquido dos extratos etanólicos, a extração ácido/base e os perfis cromatográficos obtidos por CCD forneceram os primeiros resultados para a comparação química da espécie.

3) No teste realizado por cromatografia em camada delgada com iodocloroplatinato e dragendorff não foi possível identificar a presença de alcaloides nas folhas e cálices.

4) Pelas análises por cromatografia em camada delgada das diferentes frações dos cálices, folhas e pétalas utilizando diversos reveladores químicos foi possível sugerir a presença de esteroides, terpenoides, saponinas, propilpropanoides, fenilpropanoides e flavonoides.

5) As frações dos órgãos da planta que apresentaram melhor potencial antioxidante foram a fração *n*-BuOH das pétalas ($64,3 \pm 6,2 \mu\text{g mL}^{-1}$), AcOEt das pétalas ($69,3 \pm 8,2 \mu\text{g mL}^{-1}$), e a *n*-BuOH das folhas ($87,1 \pm 15,6 \mu\text{g mL}^{-1}$), potencial moderado e também maior quantidade de fenóis ($61,5 \pm 2,8$; $30,7 \pm 1,7$ e $23,8 \pm 1,4$ mg EAG/g, respectivamente); enquanto que as frações hexânicas, hidrometanólicas dos cálices, folhas e pétalas e, o extrato etanólico das sementes não apresentaram atividade antioxidante.

6) O cromatograma do Extrato etanólico das sementes de *H. sabdariffa* apresentou 15 sinais, sendo que 11 foram identificados através da comparação com bibliotecas de espectros de massas e por índice aritmético e de similaridade.

7) As frações *n*-hexano de todos os órgãos, foram as que apresentaram melhores resultados para ensaio leishmanicida, com valores de CI_{50} de 83 ± 16 (pétalas), 40 ± 8 (folhas) e 67 ± 8 (cálices) $\mu\text{g mL}^{-1}$.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4^o ed. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007. 804 p.
- 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.
- ALAGA, T. O.; EDEMA, M. O.; ATAYESE, A. O.; BANKOLE, M. O. Phytochemical and *in vitro* anti-bacterial properties of *Hibiscus sabdariffa* L (Roselle) juice. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 8, n. 6, p. 339-344, 2014.
- ALI, B. H.; WABEL, A. N.; BLUNDEN, G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 369-375, 2005.
- APSEN Farmacêutica S/A. Disponível em: <
http://www.apsen.com.br/novas_bulas/aberta2/FITOSCAR_Bula_Paciente_V02.pdf>
Acessado em: 06/09/2016.
- ARGOLO, A. C.; SANTANA, A. E. G.; PLETSCH, M.; COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 2, p. 229-233, 2004.
- AZEVEDO, L. F. P.; FARIA, T. S. A.; PESSANHA, F. F.; ARAUJO, M. F.; LEMOS, G. C. S. Triagem fitoquímica e atividade antioxidante de *Costus spicatus* (Jacq.) S.w. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 209-215, 2014.
- BERSET, C.; CUVELIER, M. E.; BRAND-WILLIAMS, W. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT- Food Science Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BOLZANI, S. V.; VIEGAS, C.; BARREIRO J. E. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.
- BORRÁS-LINARES, I.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; ARRÁEZ-ROMANA, D.; PALMEROS-SUÁREZ, P. A.; DEL VAL-DÍAZ, R.; ANDRADE-GONZÁLEZ, 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.
- BRAZ-FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.
- BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade,

dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. **Química Nova**, v. 17, n. 5, p. 405-445, 1994.

CARVALHO, M. L.; SILVA, B. R.; SILVA, M. M.; CARCARÁ, K. A. V.; AMORIM, R. R. Estudo comparativo entre a quantidade de fenólicos totais presentes em folhas e cálices de *Hibiscus Sabdariffa* L. **Ciência, tecnologia e inovação: ações sustentáveis para o desenvolvimento regional**. Palmas, 2012.

CASE, R. J.; FRANZBLAU, S. G.; WANG, Y.; CHO, S. H.; SOEJARTO, D. D.; PAULI, G. F. Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 82-89, 2006.

CORDEIRO, C. H. G.; CHUNG, M. C.; SACRAMENTO, L. V. S. do. *Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: Hypericum perforatum e Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 15, n. 3, p. 272-278, 2005.

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.

DHAR, P.; KAR, C. S.; OJHA, D.; PANDEY, S. K.; MITRA, J. Chemistry, phytotechnology, pharmacology and nutraceutical functions of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) and roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed oil: an overview. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 323-332, 2015.

EMERY, F. da S.; SANTOS, G. B. dos; BIANCHI, R. de C. **A Química na Natureza**. Coleção Química no Cotidiano, São Paulo: Sociedade Brasileira de Química, 2010. 70 p.

ESEZOBOR, O. Z.; MAKASWA, B. A.; TOR-ANYIIN, T. A.; IGOLI, J. O. Synthesis of 4-phenylazo phenol from anthocyanins of *Delonix regia* and *Hibiscus sabdariffa* flowers. **Journal American Chemical Science** v. 11, n. 1, p. 1-7, 2016.

FRANCISCO, W.; PIVATTO, M.; DANUELLO, A.; REGASINI, L. O.; BACCINI, L. R.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; BOLZANI, V.S. Pyridine alkaloids from *Senna multijuga* as acetylcholinesterase inhibitors. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 408-413, 2012.

FINLAYS TEA SOLUTIONS. Dossiê Antioxidantes, **Food Ingredientes Brasil**, Trad. Tovani Benzaquen Ingredientes, n. 6, p. 16-30, 2009.

GALLICE, W. C; MESSERSCHMIDT, I.; PERALTA-ZAMORA, P. Caracterização espectroscópica multivariada do potencial antioxidante de vinhos. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 397-403, 2011.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

ROLÓN, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 99, n. 2. p. 103-107, 2006.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, 2015.

<http://www.recantodasletras.com.br/pensamentos/3193084> > Acessado em 06/10/2016.

JORK, H.; FUNK, W.; FISCHER, W.; WIMMER, H. Thin-Layer Chromatography. Reagents and Detection Methods, New York – NY, VCH, vol. 1, 1990.

LEMNIS FARMÁCIA. Disponível em: < <http://www.lemnifarmacia.com.br/fitoterapia-%E2%80%93-hiperico-calmante-e-antidepressivo-natural/> > Acessado em 06/09/2016.

LEPENGUE, N. A.; MOUARAGADJA, I.; M'BATCHI, B.; AKE, S. Etude de quelques caractéristiques physico chimiques du filtrat toxique de *Phoma sabdariffae* Sacc., agent pathogène de la roselle. **Sciences & Nature**, v.6, n. 2, p. 95-105, 2009.

LIN, T.; LIN, H.; CHEN, C.; LIN, M.; CHOU, M.; WANG, C. Hibiscus Sabdariffa extract reduces serum cholesterol in men and women. **Nutrition Research**, v. 27, n. 3, p. 140-145, 2007.

MENDONÇA, P. C. de. *Caracterização da diversidade genética de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville por marcador molecular AFLP e transferência de microssatélites*. 2011. VIII, 74 f. Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu. 2011.

MOHAMED, R.; FERNÁNDEZ, M.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Roselle (*Hibiscus sabdariffa*) seed oil is a rich source of γ – Tocopherol. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 3, p. 207-211, 2007.

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, p. 1055-1060, 2010.

NEVES, L. C.; ALENCAR, S. M.; CARPES, S. T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonoides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Brazilian Journal of Food Technology, VII BMCFB**, n. 15, p. 107-110, junho, 2008.

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.

OCHO-ANIN A. A. L.; KOUAKOUT, H.; BROU, K. D.; KOUADIO, Y. J.; GNAKRI, D. Evaluation of bioactive components in seeds of *Phaseolus vulgaris* L. (fabaceae) cultivated in Côte d'Ivoire. **Journal of Applied Biosciences**, v. 31, p. 1928-1934, 2010.

ODONNE, G.; BERGER, F.; STIEN, D.; GRENAND, P.; BOURDY, G. Treatment of leishmaniasis in the Oyapock basin (French Guiana): a K.A.P. survey and analysis of the evolution of phytotherapy knowledge amongst Wayãpi indians. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1228-1239, 2011.

OLALEYE, M. T. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *Journal of Medicinal Plants Research*, v.1, n. 1, p. 9-13, 2007.

OLIVEIRA, A. C. Capacidade antioxidante de farinhas de resíduos de frutas tropicais. Maceió, 2008. Dissertação (Mestrado em Ciências da saúde) – Universidade Federal de Alagoas.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OZORIO, E.; ARANGO, G. J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; PACO, M. A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities *in vitro* of *Colombian Annonaceae*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 630-635, 2007.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G.S.; VYVYAN, J.R. **Introdução à Espectroscopia**. Tradução Pedro Barros. 4ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2010.

PILLAY, P.; VLEGGAR, R.; MAHARAJ, V. J.; SMITH, P. J.; LATEGAN, C. A.; CHOUTEAU, F.; CHIBALE, K. Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staehelinoides* and their utilization towards a simplified pharmacophore. **Phytochemistry**, v. 68, p. 1200-1205, 2007.

PINTO, A. C. O Brasil dos viajantes e dos exploradores e a química de produtos naturais brasileira. **Química Nova**, v. 18, n. 6, p. 608-615, 1995.

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.

RAMIREZ-RODRIGUES, M. M.; PLAZA, M. L.; AZEREDO, A.; BALABAN, M. O.; MARSHALL, M. R. Phytochemical, sensory attributes and aroma stability of dense phase carbon dioxide processed *Hibiscus sabdariffa* beverage during storage. **Food Chemistry**, v. 134, p. 1425-1431, 2012.

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.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3, n. 1, 2005.

RIBEIRO, T. G.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; VALADARES, D. G.; FRANCA, J. R.; LAGE, P. S.; DUARTE, M. C.; ANDRADE, P. H. R.; MARTINS, V. T.; COSTA, L. E.; ARRUDA, A. L. A.; FARACO, A. A. G.; COELHO, E. A. F.; CASTILHO, R. O. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Experimental Parasitology**, v. 143, p. 60-68, 2014.

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

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. Tradução ALENCASTRO R. B. 7^aed. Rio do Janeiro: LTC, 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.

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JUNIOR, G.M.; AYRES, C. C. COSTA, L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

WAGNER, H.; BLADT, S.; *Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas*. Second Edition. Berlin: Springer, 1996. 368 p.

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.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of the Leishmaniases**. Geneva, 2010. 186 p. (Technical Reports Series, 949).

YANG, R. Y.; TSOU, S.; LEE, T. C.; WU, W. J.; HANSON, P. M.; KUO, G. Distribution of 127 edible plant species for antioxidant activities by two assays. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 86, n. 14, p. 2395-2403, 2006.

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.