



Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Ciências da Saúde
Curso de Farmácia
Trabalho de Conclusão de Curso

Andressa Ândria Martins Ribeiro

**Avaliação da atividade antioxidante de diferentes marcas de
chá de *Hibiscus sabdariffa* L.**



Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Ciências da Saúde
Curso de Farmácia

Andressa Ândria Martins Ribeiro.

**Avaliação da atividade antioxidante de diferentes marcas de
chá de *Hibiscus sabdariffa* L.**

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para aprovação
em Bacharel no curso de Farmácia da
Universidade de Brasília.

Orientadora:

Prof^a. Dra. Yris Maria Fonseca-Bazzo

Co-Orientadora:

Prof. Dra Pérola de Oliveira Magalhães



Universidade de Brasília – UnB
Faculdade de Ciências da Saúde.

**Avaliação da atividade antioxidante de diferentes marcas de
chá de *Hibiscus sabdariffa L.***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado como requisito para aprovação
em Bacharel no curso de Farmácia da
Universidade de Brasília.

Brasília, 27 de junho de 2017.

Aprovado em:

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra Pérola de Oliveira Magalhães

Me. Diegue Henrique N. Martins

a Martins Ribeiro., Andressa Ândria
 Avaliação da atividade antioxidante de diferentes
 marcas de chá de Hibiscus sabdariffa L. / Andressa
 Ândria Martins Ribeiro.; orientador Prof^a. Dra.
 Yris Maria Fonseca-Bazzo; co-orientador Prof. Dra
 Pérola de Oliveira Magalhães. -- Brasília, 2007.
 53 p.

 Monografia (Graduação - Farmácia) -- Universidade
 de Brasília, 2007.

 1. Hibiscus sabdariffa L., . 2. chá. 3. atividade
 antioxidante. 4. medicinal. I. Fonseca-Bazzo, Prof^a.
 Dra. Yris Maria , orient. II. de Oliveira Magalhães,
 Prof. Dra Pérola , co-orient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por tudo.

A toda a minha família em especial a minha mãe Maria de Jesus Martins Pereira que sempre me apoiou, ao meu pai João Ribeiro, minhas irmãs Ana Paula e Amanda, ao meu afilhado Marcos Antônio e ao meu namorado Iuri, por sempre compreenderem com amor minhas ausências durante o processo, torcendo sempre pela minha realização.

Aos meus amigos que me acompanharam por toda a graduação nos momentos felizes e nos mais difíceis, em especial ao Nélio, Gislaine, Thais e Nayra nos quais compartilhamos risos e desesperos. Aos meus amigos que me acompanham desde de sempre e que mesmo não entendendo nada do assunto, sempre me escutaram.

A todos do Laboratório de Controle da Qualidade de Medicamentos e Produtos Naturais, que com paciência sempre me ajudaram. Em especial ao Diegue Henrique Nascimento Martins pela ajuda e paciência ao esclarecer minhas dúvidas e me ajudar no processamento de dados.

A professora Dra. Yris Maria Fonseca-Bazzo, por acreditar no meu potencial durante o trabalho de iniciação científica, sempre com dedicação, paciência e atenção me abrindo as portas para o mundo da pesquisa.

A professora Pérola de Oliveira Magalhães Dias Batista, pelo acompanhamento e disposição para a realização do trabalho.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Atividade antioxidante avaliada pelo método de inibição da formação do complexo de fosfomolibdênio dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. e padrão quercetina.

Tabela 2- Atividade antioxidante avaliada pelo método de inibição da formação do complexo de fosfomolibdênio dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* e padrão ácido ascórbico.

Tabela 3- Atividade antioxidante avaliada por ensaio *ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)* dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. e do padrão AA (Ácido Ascórbico).

Tabela 4- Tabela Atividade antioxidante avaliada por peroxidação lipídica dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. e do padrão BHT (hidroxitolueno butilado).

LISTA DE FIGURAS

Figura 01: Morfologia do *Hibiscus sabdariffa* L.

Figura 02: Estruturas químicas de alguns constituintes principais da droga *vegetal Hibiscus sabdariffa* L.

Figura 03: Amostra de chá de *Hibiscus sabdariffa* L.

Figura 04: Curva Padrão da Quercetina pelo método Fosfomolibdênio.

Figura 05: Atividade antioxidante avaliada pelo método de Fosfomolibdênio dos chás preparados a partir do cálice de *Hibiscus sabdariffa* L. comparados com o padrão Quercetina.

Figura 06: Atividade antioxidante avaliada pelo método de Fosfomolibdênio dos chás preparados a partir do cálice de *Hibiscus sabdariffa* L.

Figura 07: Atividade antioxidante avaliada pelo método de Fosfomolibdênio dos chás preparados a partir do cálice de *Hibiscus sabdariffa* L.

Figura 08: Curva Padrão de Ácido Ascórbico pelo método Fosfomolibdênio.

Figura 09: Atividade antioxidante avaliada pelo método de Fosfomolibdênio dos chás preparados a partir do cálice de *Hibiscus sabdariffa* L.

Figura 10: Atividade antioxidante avaliada pelo método de Fosfomolibdênio dos chás preparados a partir do cálice de *Hibiscus sabdariffa* L.

Figura 11: Atividade antioxidante avaliada pelo método de Fosfomolibdênio dos chás preparados a partir do cálice de *Hibiscus sabdariffa* L.

Figura 12: Atividade antioxidante avaliada por ensaio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) dos chás preparados a partir do cálice de *Hibiscus sabdariffa* L.

Figura13: Atividade antioxidante avaliada por ensaio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) dos chás preparados a partir do cálice de *Hibiscus sabdariffa* L.

Figura 14: Atividade antioxidante avaliada por ensaio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity) dos chás preparados a partir do cálice de *Hibiscus sabdariffa* L

Figura 15: Atividade antioxidante avaliada por peroxidação lipídica dos chás preparados a partir do cálice de *Hibiscus sabdariffa* L.

Figura 16: Atividade antioxidante avaliada por peroxidação lipídica dos chás preparados a partir do cálice de *Hibiscus sabdariffa* L.

Figura 17: Atividade antioxidante avaliada por peroxidação lipídica dos chás preparados a partir do cálice de *Hibiscus sabdariffa* L.

RESUMO

O chá de *Hibiscus sabdariffa* L. é cultivado e consumido pelas suas características de aroma, sabor e propriedades medicinais em mais de 160 países. A planta em si tem como característica ser um arbusto perene de ciclo anual chegando a medir até 3 metros de altura, seu cálice possui formato de taça vermelha, com caule arroxeadado e folhas alternadas, possuindo ainda flores solitárias de cor amarela ou brancas nos quais possuem duração de dois dias. Sua origem é incerta sendo relatada casos na Índia e na Arábia Saudita. Seu crescimento ocorre em climas tropicais e subtropicais, sendo tolerados em solos pobres. Sua utilização é realizada através da bebida preparada através da infusão de raízes, folhas e flores. Devido a versatilidade, o consumo desse chá no Brasil vem crescendo nos últimos anos, atualmente encontram-se em destaque no mercado nacional. O presente trabalho avaliou a atividade antioxidante do chá de *Hibiscus sabdariffa* L., através de três testes distintos: *Orac* (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*), peroxidação lipídica e inibição da formação do complexo fosfomolibdênio. Como resultado podemos observar que o chá de *Hibiscus sabdariffa* L. apresentou resultados satisfatórios, apresentou atividade antioxidante, mesmo após 12 horas do seu preparo. Desta maneira, o chá se torna uma boa opção nas terapias preventivas de danos oxidativos.

Palavras chave: *Hibiscus sabdariffa* L., chá, atividade antioxidante, medicinal.

SUMÁRIO

Sumário

1	Introdução	13
1.1	Hibiscus sabdariffa L.	14
1.2	Radicais Livres;	17
1.3	Capacidade Antioxidante.	18
2	Objetivos	20
2.1	Objetivo geral	20
2.2	Objetivos específicos	20
3	Metodologia	21
3.1	Coleta da Amostra	21
3.2	Determinação da atividade antioxidante pelo método de inibição da formação do complexo de fosfomolibdênio;	22
3.2.1	Solução Reagente	22
3.2.2	Curva padrão quercetina.....	22
3.3	Ensaio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity);.....	24
3.3.1	Solução Reagente:	24
3.4	Peroxidação Lipídica;	26
3.4.1	Soluções reagentes	26
3.5	Análise estatística.....	29
4	Resultados e Discussão	30
4.1	Determinação da atividade antioxidante pelo método do fosfomolibdênio	30
4.1.1	Curva padrão quercetina.....	30
4.1.2	Padrão Ácido Ascórbico (C ₆ H ₈ O ₆)......	34
4.2	Ensaio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)	37
4.3	Peroxidação Lipídica;	42
5	Conclusão	48
6	Referência bibliográfica	49

1 Introdução

Plantas Medicinais

Desde do começo da humanidade o homem busca na natureza, recursos nos quais melhorem sua qualidade de vida. Visto que, nos primórdios as plantas já eram consideradas importantes na vida da população; podendo ser como alimento, como fins curativos e ou ritualísticos. Embora a medicina alopática esteja bem desenvolvida nos dias atuais, em grande parte dos países, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece que 85% da população que utiliza a atenção primária, consome plantas ou suas preparações. A OMS também relatou que a prática medicinal tradicional vem crescendo globalmente na última década ganhando popularidade (BRASIL, 2006). Um dos fatores que podem advir essa popularidade pode ser pelo aumento da população idosa, além do aparecimento de doenças crônicas na população em geral.

As políticas de plantas medicinais, são realizadas visando a integração do uso da planta que usuário possui de fácil acesso que podem ajudar na prevenção e na cura de doenças. Dentro dessas políticas temos como exemplo a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares, a Política Nacional de Medicamentos, o Programa Nacional de Plantas Medicinais, dentre outras. Nesse cenário o chá se torna uma bebida popular, devido suas propriedades sensoriais e por deter substâncias químicas que podem interferir diretamente no nosso corpo (MARÍN *et al*, 2015). Logo, devido a versatilidade, o consumo de chá no Brasil vem crescendo, encontrando em destaque no mercado nacional (NUNES *et al*, 2014) como forma de se obter propriedades que podem reduzir o risco de doenças. (ROCHA, 2014). Nesse contexto, a nutrição foi reconhecida como fundamental para prevenir o estresse oxidativo, devido a capacidade redox dos alimentos e bebidas (PRENESTI *et al*, 2007).

Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o termo chá uma forma farmacêutica de uma droga vegetal com fins medicinais a ser preparada por meio de infusão, decocção ou maceração em água pelo consumidor (BRASIL, 2005).

Assim, a alimentação saudável atua como uma das ferramentas terapêuticas para um envelhecimento saudável, desse modo, muitos estudos epidemiológicos em

doenças crônicas concluíram que a forma mais efetiva de prevenção para uma doença específica, é a prevenção primária, na qual é feita através de uma nutrição balanceada (COITINHO *et al*, 2000).

1.1 *Hibiscus sabdariffa* L.

A *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) é uma planta medicinal, com distribuição incerta, na qual não se sabe o seu local de descoberta, podendo ser da Índia ou da Arábia Saudita. Seu cultivo é verificado tanto no clima tropical quanto em regiões subtropicais (ROCHA *et al*, 2014). Popularmente, é conhecida como azedinha, azeda-da-guiné, caruru-azedo, carurada-guiné, chá-da-jamaica, pampolha, pampulha, papoula-de-duas-cores, quiabeiro-azedo, quiabo-azedo, quiabo-de-angola, quiabo-róseo, quiabo-roxo, rosélia e vinagreira (RAMOS *et al*, 2011). No Brasil seu uso possivelmente veio pela prática africana, na qual contribuiu para o conhecimento sociocultural (MONTELES *et al*, 2007) A *H.sabdariffa* é um arbusto perene de ciclo anual que possui cerca de 2 a 3 m de altura (RAMOS *et al*, 2011). O cálice possui um formato de taça vermelha, de caule arroxeadado, com folhas alternando de verde a roxo, e flores solitárias de cor amarela, axilares que duram um dia (SOBOTA *et al*, 2016) (Figura 01).

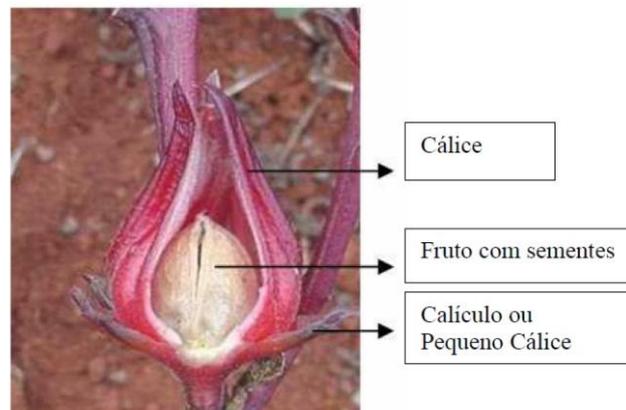


Figura 1: Morfologia do *Hibiscus sabdariffa* L.

Fonte: (ROSA, 2013, p.14).

A *H. sabdariffa* é fácil de crescer em solos bem drenados, podendo tolerar solos pobres, levando em média de 4 a 8 meses para o seu crescimento total, em temperaturas noturnas de no mínimo de 20°C, sendo assim cultivada em áreas tropicais e subtropicais. Seu florescimento é realizado em dias curtos, devido ao fato

de ser sensível ao fotoperíodo (ROCHA *et al*, 2004; ROSA, 2013; YAMAMOTO *et al*, 2007).

Devido a uma colheita ideal, a *H. sabdariffa* se desenvolve de maneira fácil em vários tipos de ecossistema. Na China, foi notado o uso do óleo para fins medicinais, no oeste da África a folha pulverizada é usada na suplementação das refeições (ROCHA *et al*, 2014). Suas folhas, cálices, sementes e fibras são utilizados na alimentação de animais, na indústria de tecido, papel e no preparo de bebidas com fins culinários e medicinais (RAMOS *et al*, 2011). Suas preparações comerciais de concentrados de *H. sabdariffa* são comumente encontradas como fluido ou pó para a preparação de bebidas instantâneas ou infusões. O tratamento térmico dos seus cálices desidratados, produzem uma bebida rica em compostos fenólicos com propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias e antidiabéticas (ROCHA, 2014). Além disso, seu uso generalizado como tratamento à base de ervas na medicina popular tem levado a um elevado grau de aceitação pela população em geral (GUARDIOLA *et al*, 2014). Desse modo, a *H. sabdariffa* no decorrer dos tempos tem chamado a atenção da indústria farmacêutica (FREITAS *et al*, 2013).

Na medicina antiga seu extrato é efetivo em vários tratamentos (IYARE *et al*, 2010). No campo científico a planta apresenta vários efeitos terapêuticos, como hepatoprotetor, mostrando alterações bioquímicas e histológicas em ratos que possuíam *diabetes mellitus* (ADEYEMI *et al*, 2014); melhora a diminuição da acumulação lipídica induzida pelo fígado, na obesidade (HUANG *et al*, 2015); atividade antioxidante, anticolesterol (RAMOS *et al*, 2011); anti-hipertensivo agindo como vaso dilatador no musculo liso vascular (MICUCCI *et al*, 2015); antibacteriano (ROCHA *et al*, 2014); Droga promissora para o combate do vírus influenza (BAATARTSOGT *et al*, 2016); além de ter grande potencial em células anti-tumorais (ASN *et al*, 2015). Culturalmente é utilizado como diurético, para o tratamento de desordem intestinal e antipirético (ROSA, 2013). Tendo ainda melhora no ganho de peso saudável em gestantes, o que também pode ser usado na melhora de alguns casos de anorexia (IYARE *et al*, 2010).

Estudos realizados apontam que a *H. sabdariffa* possui alto teor de ácido ascórbico, vitamina A, licopeno (ROSA, 2013), íons de sódio e de Ferro (IYARE *et al*, 2010); polissacarídeos, pectinas mucilaginosas (BORRÁS-LINARES *et al*, 2015);

polifênicos como: ácidos orgânicos, ácidos protocateicos (Figura 02-3), taninos e compostos fenólicos. Os compostos fenólicos encontrados são as antocianinas: delphinidina 3-xilosilglucosídeo, cianidina 3-xilosilglucosídeo (Figura 02-2), cianidina 3-glicosídeo e a delphinidina 3-glicosídeo (Figura 02-1) (VIZZOTTO *et al*, 2008), elas são detectadas em quantidades elevadas nos cálices, sendo responsáveis pela cor vermelha (BORRÁS-LINARES *et al*, 2015), também estão presentes flavonóides como quercetina, luteolina, a hibiscetina (Figura 02-4), sabdaretina, gossipetina (Figura 02-5). Essas substâncias são consideradas constituintes bioativos importantes no processo de ação antioxidante (VIZZOTTO *et al*, 2008). Estes componentes são influenciados por fatores genéticos, por uma adubação na qual abrange nutrientes essenciais que em conjunto com as condições ambientais e com a maturação formam uma planta que contenha altas concentrações de bioativos (ROSA, 2013). Esses fatores podem ser obtidos por meio da produção de mudas de boa qualidade, que iram atuar na composição do substrato.

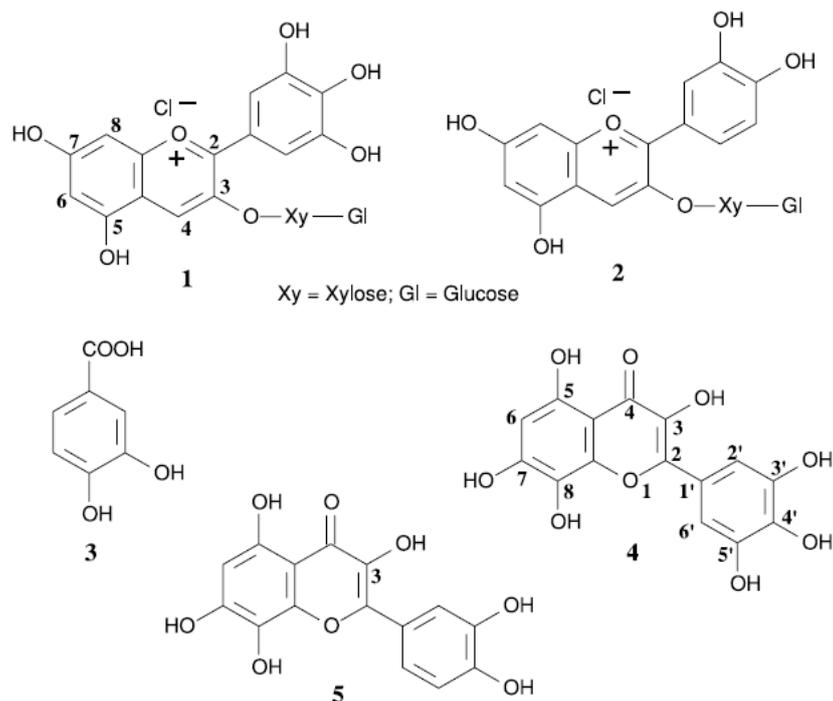


Figura 02: Estruturas químicas de alguns constituintes principais da droga vegetal *Hibiscus sabdariffa* L. Os compostos presentes são: (1) delphinidina 3-glicosídeo, (2) cianidina 3-xilosilglucosídeo, (3) ácidos protocateicos, (4) hibiscetina e (5) gossipetina.

Fonte: (ALI *et al*, 2005, p.2)

O chá de *H. sabdariffa* é produzido com a secagem dos cálices após a sua colheita, a capsula é retirada a uma temperatura menor que 43 °C, a secagem tem

como produção a escala 10:1, sendo assim, para cada 100 Kg de cálice fresco, 1 Kg de cálices secos são produzidos, para ser passados por um processo de trituração e assim poderem ser comercializados (CASTRO, 2003). O chá possui um aroma característico e gosto amargo (MARÍN *et al*, 2015). O seu alto teor de polifenóis pode explicar a capacidade antioxidante do chá à base de *H. sabdariffa*. Desse modo, o seu chá pode ser considerado uma bebida protetora contra radicais livres (PRENESTI *et al*, 2007). O chá obtido a partir do cálice da flor contém polissacarídeos em boas quantidades, açúcares redutores, como a glicose e a frutose, além de ser rico em cálcio, magnésio, niacina, riboflavina, ferro e vitaminas A e C, ácidos como o tartárico, succínico, málico, oxálico, cítrico e hibíscico, possuindo uma quantidade significativa de fibras alimentares (VIZZOTTO *et al*, 2008). Logo, como a sua infusão é capaz de preservar os polifenóis, as bebidas à base de *H. sabdariffa* poderão ser alternativas no uso de bebidas como vinho tinto para crianças e pessoas que não utilizam álcool (PRENESTI *et al*, 2007).

Entretanto, o uso do chá indiscriminadamente, deve ser um fator a se observar devido ao fato de que estudos toxicológicos conduzidos em ratos, demonstraram que doses elevadas podem ocasionar problemas no fígado e no sistema reprodutor masculino, reduzindo a fertilidade (VIZZOTTO *et al*, 2009). Logo o uso do chá por 7 dias incluindo períodos de interrupção, trata-se de um cuidado para evitar o aparecimento de problemas renais e hepáticos. Outro ponto a ser observado é a interação com drogas que podem ser usadas em conjunto com o chá, no parâmetro farmacocinético temos divergências sobre o potencial de interação do extrato aquoso da *H. sabdariffa*, segundo o estudo de 2006, no qual foi demonstrado que a atividade não modulou a atividade do citocromo P₄₅₀ (Prommetta *et al*, 2006). Porém outro estudo realizado em 2013, foi elucidado que o extrato etanólico possui inibição de nove isorformas da CYP, logo o extrato aquoso poderá ter interação, mesmo sendo em menor intensidade, inferindo ainda que a co-administração pode trazer inibição do fármaco pelo mecanismo de primeira passagem (JOHNSON *et al.*, 2013), outros estudos demonstraram que o chá possui interação com o medicamento diclofenaco tendo interferência significativa no seu metabolismo, reduzindo sua excreção, o que pode levar a um alto ou decaimento da faixa terapêutica ideal (FAKEYE *et al.*, 2007). Em contra partida com o drogas que usam o metabolismo via cloroquina e com a droga paracetamol não teve interação significativo. Entretanto são necessários novos estudos para outros fármacos (ALI *et al*, 2005).

1.2 Radicais Livres;

Os radicais livres vêm obtendo grande destaque no ambiente de pesquisa devido ao advento de trabalhos nas quais demonstram o efeito destes e outros agentes oxidantes no organismo (RAMOS *et al*, 2011). Radicais livres são espécies químicas com um ou dois elétrons na sua camada mais externa (TCHOUYA *et al*, 2016), o que os tornam espécies com átomos instáveis (VICTOR *et al*, 2014).

Os radicais livres podem ser desenvolvidos por diversas maneiras: exógenos (por exemplo, radiação ultravioleta, poluição, infecções e tabaco); ou endógenos, através do estresse oxidativo (TCHOUYA *et al*, 2016) que uma vez formado, induz a capacidade do sistema biológico de neutralizar os radicais livres (VICTOR *et al*, 2014).

A falta de antioxidantes ou uma superprodução nos radicais livres pode levar ao desequilíbrio entre o sistema oxidante e o antioxidante. (TCHOUYA *et al*, 2016) Esse desequilíbrio é relacionado aos processos que provocam dano ao DNA. Como exemplos, temos a mutagênese, a carcinogênese, o envelhecimento (VICTOR *et al*, 2014), doenças cardiovasculares e doenças degenerativas como a aterosclerose, diabetes, doença de Alzheimer, doença de Parkinson, glaucoma e alterações maculares associadas à degeneração.

A obtenção de antioxidantes através da dieta é um meio simples de reduzir o desenvolvimento de doenças provocadas pelo estresse oxidativo (TCHOUYA *et al*, 2016). Desta maneira, como forma de bloquear o desequilíbrio do sistema oxidante, vem se estudando novas formas de se encontrar substâncias antioxidantes, nas quais proporcionam segurança e eficácia (RAMOS *et al*, 2011).

1.3 Capacidade Antioxidante.

O antioxidante age transferindo um elétron para os radicais livres, o que os tornam estáveis à medida que seus elétrons são emparelhados. Isso impede danos às células e tecidos causados pelo estresse oxidativo (TCHOUYA *et al*, 2016). Por conseguinte, a espécie em estudo apresenta a capacidade de possuir uma molécula antioxidante, possibilitando o bloqueio ou retardo dos radicais livres (RAMOS *et al*, 2011).

H. sabdariffa apresenta propriedades antioxidantes promissoras em ensaios *in vitro* e *in vivo*, sendo que o extrato aquoso de *H. sabdariffa* mostrou que atua no CCL₄ (tetracloreto de carbono) que é um mediador do estresse oxidativo (VICTOR *et al*, 2014). Sua presença induz a liberação de enzimas hepáticas que aumentam os produtos da peroxidação lipídica ou inativa as enzimas antioxidantes

(RITTER,2007). O estudo em questão foi realizado em ratos, nos quais foram dosados o CCL₄, tendo como resultado a diminuição do mediador (VICTOR *et al*, 2014).

A baixa densidade da lipoproteína LDL é um dos fatores que causam riscos cardiovasculares. Estudos indicam que a aterosclerose é afetada na formação da oxidação de LDL. O uso de *H. sabdariffa* mostrou ter grande poder antioxidante e com potencial inibidor dos efeitos da oxidação do LDL. Podendo ser assim, preventivo no tratamento de doenças crônicas, como a melhora da aterosclerose (LIN *et al*, 2015).

Em estudo realizado por Ramos *et. al.* (2011) foi observado correlação de antocianina e a capacidade antioxidante nos extratos aquosos das flores da *H. sabdariffa* comprovando que seu poder antioxidante, depende da estrutura química e da concentração dos constituintes bioativos, nos quais poderão ter como influência fatores genéticos e o modo na qual a planta é cultivada (RAMOS *et al*, 2011).

Assim , observando o cenário apresentado, esse trabalho objetivou verificar, se após as 12 horas de preparo, o chá de *H. sabdariffa* mantém sua atividade antioxidante e se as marcas disponíveis no mercado do Distrito Federal (DF) possuem um produto de qualidade.

2 Objetivos

2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antioxidante de diferentes marcas do chá de *Hibiscus sabdariffa* L.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a capacidade antioxidante com a utilização de três métodos *in vitro*, nos quais possuem diferentes mecanismos, como o de fosfomolibdênio, *ORAC* (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) e peroxidação lipídica.
- Avaliar se existe diferença da atividade antioxidante entre as diferentes marcas.
- Avaliar se existe diferença da atividade antioxidante em diferentes tempos posterior ao preparo do chá.

3 Metodologia

3.1 Coleta da Amostra

A droga vegetal de *H. sabdariffa* foi adquirida em pontos diferentes do comércio local do DF, em três marcas diferentes (A, B e C). Todas as marcas têm como característica o extrato seco do cálice da espécie vegetal. Não sendo identificado na embalagem o processo de liofilização. (Figura 03). As embalagens vieram em um saco plástico, com descrição de modo de preparo, o nome da espécie, lote, data de validade, informações sobre o distribuidor, entretanto em apenas uma das marcas foi observado as informações nutricionais sobre o produto.



Figura 03: Amostra de chá de *Hibiscus sabdariffa* L.

Para a realização dos ensaios foram preparados os chás seguindo o modo do uso da embalagem, na qual especifica a preparação de modo padronizado em todas elas; feita com uma xícara de chá (150 mL) de água fervente sobre uma colher de sobremesa (2 g) do produto. Realizando assim, o processo de infusão por 15 minutos, com uma concentração de 13,3 mg/mL.

Após o preparo, os chás foram transferidos para garrafas de plástico de material opaco sob temperatura ambiente, no qual foram armazenadas. Após 1 hora de preparo e depois de 12 horas de preparo os ensaios foram realizados.

3.2 *Determinação da atividade antioxidante pelo método de inibição da formação do complexo de fosfomolibdênio;*

O objetivo desse ensaio foi avaliar a atividade antioxidante pelo método de inibição da formação do complexo de fosfomolibdênio, que determina de modo quantitativo a redução de molibdênio VI para molibdênio V que pôde ser observado com a formação da coloração verde (fosfato/ molibdênio V) em pH ácido (PRIETO *et al*, 1999).

3.2.1 Solução Reagente

A solução reagente foi preparada a partir de três substâncias: 1,199 g de fosfato de sódio tribásico ($\text{Na}_2\text{PO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ – 0,1 M), 3,0896 g de molibdato de amônio $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}]$ – 0,025 M, 12,645 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) – 2,4 M. Cada substância foi dissolvida e diluída em quantidade suficiente para 100 mL de água destilada em balão volumétrico.

Para o dia do ensaio foi preparado a solução reagente de 40 mL misturando-se: 11,2 mL de fosfato de sódio monobásico anidro (NaH_2PO_4) com concentração final de 28 nM, 10 mL de ácido sulfúrico (H_2SO_4) com concentração final de 0,6 M e 6,4 mL de molibdato de amônio $[(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}]$, com concentração final 4 nM. Após a mistura de cada componente, completou-se para 40 mL com água destilada.

3.2.2 Curva padrão quercetina.

A solução mãe de quercetina 1 mg/mL foi preparada com 10 mg da quercetina e adição de 10 mL de etanol. Acondicionou-se ao abrigo da luz.

A partir da solução mãe realizou-se a diluição em sete tubos de ensaios em concentrações gradativas (0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,15; 0,2 mg/mL) com

triplicatas diluídas em etanol. Para cada concentração de realizou-se em microtubos de fundo cônico graduados comportando 100 μL de cada concentração e foi adicionado 1000 μL da solução reagente em cada triplicada, assim como no controle. Os dois brancos foram preparados com 100 μL de álcool e 1000 μL da solução de reagente.

As amostras, controles e brancos foram dispostos em banho-maria (95 °C) por 90 minutos e ao resfriar, as triplicatas foram analisadas em espectrofotômetro a 695 nm.

3.2.3 Curva padrão ácido ascórbico ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_6$)

A solução mãe de ácido ascórbico 1 mg/mL foi preparada com 10 mg da ácido ascórbico e adição de 10 mL de água destilada. Foi acondicionada ao abrigo de luz.

A partir da solução mãe realizou-se a diluição em setes tubos de ensaios em concentrações gradativas (0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,125; 0,15; 0,2 mg/mL) com triplicatas diluídas em água destilada. Para cada concentração gradativa de ácido ascórbico realizou-se triplicatas em microtubos de fundo cônico graduados comportando 100 μL de cada concentração de ácido ascórbico e adicionou-se 1000 μL da solução reagente em cada triplicada, assim como no controle. Os brancos do aparelho foram preparados com 100 μL de água destilada e 1000 μL da solução de reagente.

As preparações em triplicatas, os controles e os brancos, foram dispostos em banho-maria (95°C) por 90 minutos. Ao resfriar, as triplicatas foram analisadas em espectrofotômetro a 695nm.

3.2.4 Amostra: chás de *Hibiscus sabdariffa* L.

A amostra de chá de *H. sabdariffa* L a 1 mg/mL foi diluída em duas distintas concentrações: 0,2mg/mL e 0,4mg/mL e acondicionadas ao abrigo de luz.

A partir da solução mãe realizou-se a diluição em tubos de ensaio em quantidades gradativas (200 μ L e 400 μ L) com adição de sua respectiva quantidade suficiente para 1000 μ L de água destilada (800 μ L, 600 μ L). Para cada concentração gradativa de chá realizou-se triplicatas em microtubos de fundo cônico graduados comportando 100 μ L de cada concentração da amostra e adicionou-se 1000 μ L da solução reagente em cada triplicada, assim como no controle. O branco do aparelho e o branco do ensaio, foram preparados com 100 μ L de água destilada e 1000 μ L da solução de reagente. As preparações foram dispostas em banho-maria (95 °C) por 90 minutos. Ao resfriar, as triplicatas foram analisadas em espectrofotômetro a 695 nm.

A determinação quantitativa da equivalência da amostra com cada padrão foi realizada com base no coeficiente de absorção e na regressão linear obtida (Pietro *et al*, 1999).

3.3 Ensaio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity);

O ensaio determina a atividade antioxidante através da quantificação do processo de proteção de uma molécula fluorescente, que misturada com radicais livres induz a oxidação da mesma. Logo, quanto maior a fluorescência demonstrada no aparelho maior será o poder antioxidante da amostra. (PRIOR *et al*, 2015).

3.3.1 Solução Reagente:

3.3.1.1 Solução Tampão Fosfato pH 7,4

- Solução A (0,02 mol) - 2,4 g de NaH_2PO_4 completados em um balão de 100 mL (q.s.p.) de água ultrapura;
- Solução B (0,01 mol) -26,81 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ completados em um balão de 500 mL (qsp) de água ultrapura;

As duas soluções foram misturadas com 71 mL de solução A e 304 mL de solução B em q.s.p. 1 L de água ultrapura com concentração final de 53,15mmol/L.

Na qual foi verificado o pH da solução de 7,4. Essa solução tampão foi armazenada sob refrigeração (EMBRAPA,2009).

3.3.1.2 Preparo de solução de fluoresceína em tampão fosfato pH 7,4.

A solução de fluoresceína (16,371.10-8mol/L) foi preparada em tampão fosfato 10 mg de fluoresceína em 50 mL de tampão, solução na qual foi armazenada sobre refrigeração. Para o ensaio foi realizada a solução de 15,4 µL da solução mãe em 50 mL de tampão fosfato (EMBRAPA,2009).

3.3.1.3 Solução de AAPH (2,2'-Azobis(2-methypropionamidine) em tampão fosfato pH 7,4

Solução AAPH em tampão com concentração 178 mmol/L foi realizada inserindo 241,3 mg AAPH em 5 mL de tampão (EMBRAPA,2009).

3.3.2. Padrão ácido ascórbico (C₆H₈O₆).

A solução mãe de ácido ascórbico 1 mg/mL foi preparada com 10 mg de ácido ascórbico e adição de 10 mL de tampão fosfato. Acondicionou-se ao abrigo de luz.

A partir da solução mãe realizou-se a diluição em setes tubos de ensaios em concentrações gradativas (0,5; 1; 2; 4; 6; 8 µg/mL) em triplicatas diluídas em tampão fosfato. Em Tubos de ensaio a parte foram adicionados 0,750 mL de ácido ascórbico para cada concentração, sendo também adicionadas alíquotas de 1,5 mL de fluoresceína . No controle positivo e negativo foi adicionado 0,750 mL de tampão e 1,5 mL de fluoresceína que foram submetidos ao banho maria por 5 minutos á 37°C. Após os 5 minutos foram adicionados 0,750 mL de AAPH, com diferença de 1 minuto para cada tubo de ensaio. Entretendo, para o controle negativo foi adicionado o tampão fosfato no lugar do AAPH.

O produto da reação foi analisado em fluorímetro, com excitação 485 nm e emissão de 520nm.

3.3.3 Chás de *Hibiscus sabdariffa* L.

As amostras de chás de *Hibiscus sabdariffa* L. a 1 mg/mL foram diluídas em seis distintas concentrações. A partir da solução mãe analisou-se a diluição em setes tubos de ensaios em concentrações gradativas (0,5; 1; 2; 4; 6; 8 µg/mL) com triplicatas diluídas em tampão fosfato. Para cada concentração gradativa de *H. sabdariffa* L. realizou-se triplicatas de reação em tubos de ensaio com 0,750 mL de cada concentração de amostra e adicionou-se 1,5 mL da fluoresceína em cada triplicada, nos controles positivos e negativos foram adicionados 0,750 mL de tampão e 1,5 ml de fluoresceína que foram levados em banho maria por 5 minutos á 37°C. Após os 5 minutos foram adicionados 0,750 mL de AAPH, com diferença de 1 minuto para cada tubo de ensaio. Para o controle negativo foi adicionado o tampão fosfato.

As amostras foram analisadas em fluorímetro, com excitação de 485 nm e emissão de 520nm.

A determinação da atividade antioxidante seguiu o cálculo do índice antioxidante da amostra em percentual (%) utilizando a fórmula: $IA\% = (A/C) \times 100$, onde A é a média aritmética das absorbâncias da amostra e C é a medida das absorbâncias do controle positivo (PRIOR *et al*, 2015).

3.4 Peroxidação Lipídica;

A peroxidação lipídica constitui a principal causa da decomposição dos corpos graxos, logo sua inibição é uma atividade característica dos antioxidantes. O método avalia a atividade antioxidante de modo quantitativo por meio da reação do ácido tiobarbitúrico (*TBA*) com os produtos de decomposição dos hidroperóxidos. Um dos produtos dessa reação é o malonaldeído que reage com o *TBA* formando o complexo de cor vermelha. A reação acontece em meio ácido e em altas temperaturas para aumentar a velocidade e sensibilidade do teste (BORGES, 2011).

3.4.1 Soluções reagentes

3.4.1.1 Solução ácido acético 20%

- Foi inserido 40,12 mL de ácido acético, diluído em 200 mL (qsp) de água destilada;

3.4.1.2 Solução de TBA em SDS 1,1 %

- Solução de SDS 1,1 %- Foi diluído 2,2 g em 200 mL (qsp) de água destilada;
- Solução de TBA em SDS 1,1% – 1,6 g diluído em 200 mL da solução de SDS preparada anteriormente. A solução foi levada ao ultrassom por 50 minutos;

3.4.1.3 Solução de Cloreto de Potássio 1,5%;

- 3g diluídos em 200 mL de água destilada (qsp);

3.4.1.4 Solução de gema de Ovo (10%);

- 200 mg da gema do ovo em 20 mL de KCl 1,5%; Recomenda-se que essa mistura seja levada ao ultrassom por 5 minutos (MIGUEL *et al*, 2004).

3.4.1.5 Solução Tampão fosfato pH: 7,4;

Solução tampão inserida no método de ORAC.

3.4.1.6 Solução AAPH (2,2'-Azobis(2-methypropionamide) em tampão;

A solução com concentração 6,33 mg/ mL Foi diluída 95mg em 15 mL de Tampão Fosfato.

3.4.2 Solução padrão de BHT (*hidroxitolueno butilado*);

A solução mãe de BHT 1 mg/mL foi preparada com 10 mg de BHT e adição de 10 mL de etanol. Acondicionou-se ao abrigo de luz. A partir da solução mãe realizou-se a diluição em oito tubos tipo *Falcon* em concentrações gradativas (2,0; 1,8; 1,6; 1,4; 1,2; 1,0; 0,8; 0,6 µg/mL) com triplicatas diluídas em etanol. Para cada concentração gradativa de BHT analisou-se triplicatas de reação em tubos tipo *Falcons* com 100 µL de cada concentração de BHT e adicionou-se, 500 µL da solução de gema de ovo 1:10, 400 µL de água destilada, 50 µL de AAPH, 1,5 mL de

ácido acético e 1,5 mL de solução TBA em SDS em cada triplicada, no controle positivo foram adicionados todos os componentes menos a amostra. No controle negativo não foram adicionados à amostra nem solução de AAPH, sendo adicionados no lugar o solvente respectivo de cada uma das soluções mãe dos padrões e das amostras.

Os tubos foram levados ao banho maria por 60 minutos a 95 °C. Após esse tempo foram adicionados 5 mL de butanol, os tubos foram submetidos ao vórtex. Posteriormente os tubos foram levados a centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos.

A análise da reação foi realizada em espectrofotômetro à 533nm.

3.4.3 Amostra: Chás de *Hibiscus sabdariffa* L.

A amostra de chás de *H. sabdariffa* (1mg/ mL) foi diluída em distintas concentrações, a partir da solução mãe analisou-se a diluição em cinco tubos tipo *Falcon* em concentrações gradativas (0,5; 1;2; 4;6; 8 µg/mL) com triplicatas diluídas em água destilada. Para cada concentração gradativa de chás de *H. sabdariffa* realizou-se triplicatas de reação em tubos tipo *Falcon*, com 100 µL de cada concentração de chás e adicionou-se, 500 µL da solução de gema de ovo (1:10), 400 µL de água destilada, 50 µL de AAPH, 1,5 mL de ácido acético e 1,5 mL de solução TBA em SDS em cada triplicada. No controle positivo foram adicionados todos os componentes menos a amostra e a solução de AAPH, logo obtivemos o valor de 100% da fluorescência, já no controle negativo não foram adicionadas à amostra, assim obtivemos o valor de 100% de oxidação. Nos dois tipos de controles foram adicionados em contrapartida o solvente proveniente dessas soluções.

Os tubos foram levados para banho maria por 60 minutos a 95 °C. Após esse tempo foram adicionados 5 mL de butanol, os tubos foram submetidos ao vórtex. Os tubos foram levados para centrifuga a 3000 rpm durante 10 minutos.

A análise da reação foi realizada em espectrofotômetro à 533 nm.

A determinação da atividade antioxidante seguiu o cálculo do índice de inibição da atividade antioxidante da amostra em percentual (%) utilizando a fórmula: $IA\% = (A/C) \times 100$, onde A é a média aritmética das absorbâncias da amostra e C é o controle totalmente oxidado (MIGUEL *et al*, 2004).

3.5 Análise estatística

Os tratamentos dos dados obtidos nos ensaios foram realizados com a utilização dos softwares Microsoft Office Excel® 2016 e GraphPad Prism® Version 6.0. Os dados do método de fosfomolibdênio foram expressados em equivalência através da regressão linear. Já para os métodos de ORAC e Peroxidação Lipídica, os índices da atividade antioxidantes foram dados através dos valores de IC_{50} , que foram obtidos através de regressão linear no programa *GraphPad Prism® Version 6.0*.

A partir dos valores obtidos foram aplicados testes de comparação com $p < 0,05$. Os testes realizados foram *Kruskal- Wallis -Dunn's* e o método de *Wilcoxon* no programa *GraphPad Prism® Version 6.0*. Esses testes foram escolhidos pois possibilita, com os dados assimétricos de forma não paramétrica calcular quem da população em destaque é semelhante.

4 Resultados e Discussão

4.1 Determinação da atividade antioxidante pelo método do fosfomolibdênio

O método de avaliação da atividade antioxidante determina de modo quantitativo a redução de molibdênio VI para molibdênio V que poderá ser observado com a formação da coloração verde (PRIETO et al, 1999). Na análise em questão podemos observar que houve uma evidente correlação entre o poder de redução da espécie e a formação do complexo verde. Mostrando boa capacidade de atividade antioxidante. Os ensaios tiveram dois padrões de referência (ácido ascórbico e quercetina), os quais foram usados como padrões de equivalência para quantificar as amostras testadas.

Foi observado pelo método de inibição da formação do complexo de fosfomolibdênio que as amostras de chá mostraram ter atividade antioxidante por terem inibido a formação de complexo. A quantificação foi realizada pela substituição das absorbâncias obtidas na equação da reta obtida por regressão linear da curva analítica dos padrões utilizados. Não foi observado diferenças significativas na atividade antioxidante das marcas avaliadas no Distrito Federal.

4.1.1 Curva padrão quercetina.

A partir da regressão linear obteve-se a curva analítica do padrão quercetina ($y = 1,457x + 0,1687$, $r = 0,9950$) (figura 4).

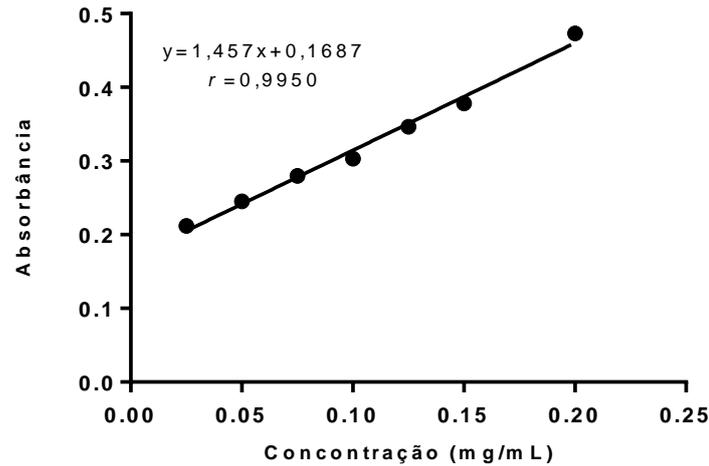


Figura 04: Curva padrão da atividade antioxidante de quercetina pelo método de inibição do complexo fosfomolibdênio.

A partir da equação, podemos correlacionar o quanto a amostra é equivalente ao padrão (Tabela 1) e a partir dos valores obtidos foi aplicado o teste de comparação *Kruskal- Wallis -Dunn's* (Figura 05). Além disso, foi observado que as marcas entre si demonstraram diferenças significativas apenas após as 12 horas entre as marcas B2 e C2 (Figura6).

Tabela 1 - Atividade antioxidante avaliada pelo método de inibição da formação do complexo de fosfomolibdênio dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa*

Amostra	Concentração $\mu\text{g/ml}$	Média \pm desvio padrão (3,9 QE/ μg);	L. do padr ão.
A1	400	0,233 \pm 0,009	Os dados s repre senta m a médi
B1	400	0,246 \pm 0,015	
C1	400	0,138 \pm 0,000	
A2	400	0,140 \pm 0,010	
B2	400	0,116 \pm 0,002	
C2	400	0,068 \pm 0,008	

a das triplicatas dos valores de equivalência \pm desvio padrão da quantidade equivalente do padrão de quercetina (QE) de 3,9 μg das flores. As letras A, B e C representam lote/marca dos produtos adquiridos contendo a droga vegetal de *H. sabdariffa*. O número "1" posterior as letras A B e C refere-se aos chás avaliados depois de uma hora de preparo e o número "2" refere-se aos chás avaliados depois de doze horas de preparo.

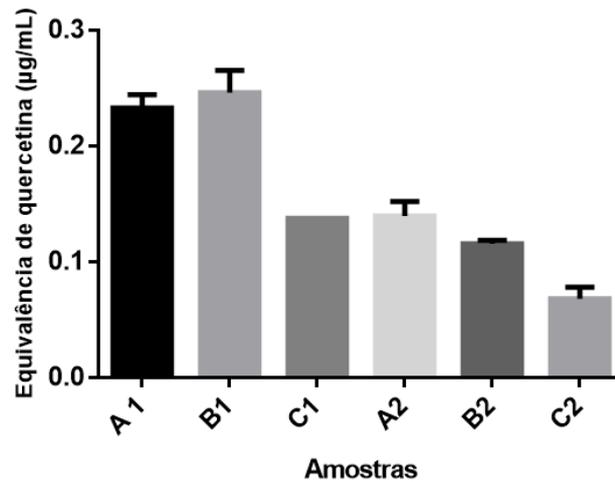


Figura 05: Atividade antioxidante avaliada pelo método de inibição da formação do complexo fosfomolibdênio dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. Kruskal-Wallis – Dunn's. Os dados representam mediana das triplicatas \pm intervalo interquartis. Não foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras analisadas. As letras A, B e C representam lote/marca dos produtos adquiridos contendo a droga vegetal de *H. sabdariffa*. O número "1" posterior as letras A, B e C refere-se aos chás avaliados depois de uma hora de preparo e o número "2" refere-se aos chás avaliados depois de doze horas de preparo.

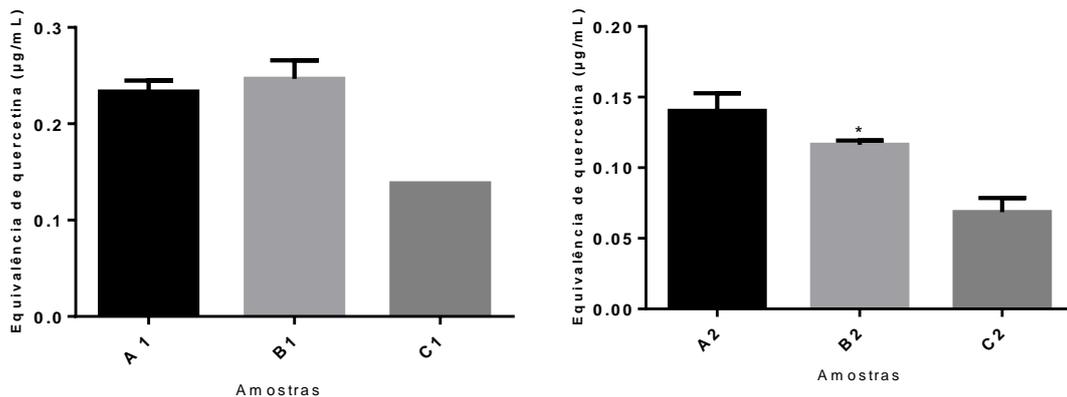


Figura 06: Atividade antioxidante avaliada pelo método de inibição da formação do complexo de fosfomolibdênio dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. Kruskal-Wallis – Dunn's. Os dados representam a médiana das triplicatas \pm intervalo interquartis. Foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras analisadas. *demonstrou-se diferente de C2 entre as amostras analisadas. O número "1" posterior as letras A, B e C refere-se aos chás avaliados depois de uma hora de preparo e o número "2" refere-se aos chás avaliados depois de doze horas de preparo.

Outro ponto observado é que ao decorrer do tempo de preparo, houve decréscimo da atividade antioxidante nos chás de 1 hora para 12 horas, na amostra A se obteve decréscimo de 39%, já na amostra B C o decréscimo foi de 50%, entretanto através do método de comparação por *Wilcoxon*, não houve diferenças significativas estatisticamente, logo o chá mesmo após 12 horas de preparo manteve

a atividade antioxidante (Figura 07). Esses resultados são de grande ajuda para elucidar, como o chá se comporta no decorrer do preparo até a hora de consumo, os valores de equivalência em comparação ao padrão quercetina demonstrados na tabela 1, se mostraram satisfatórios.

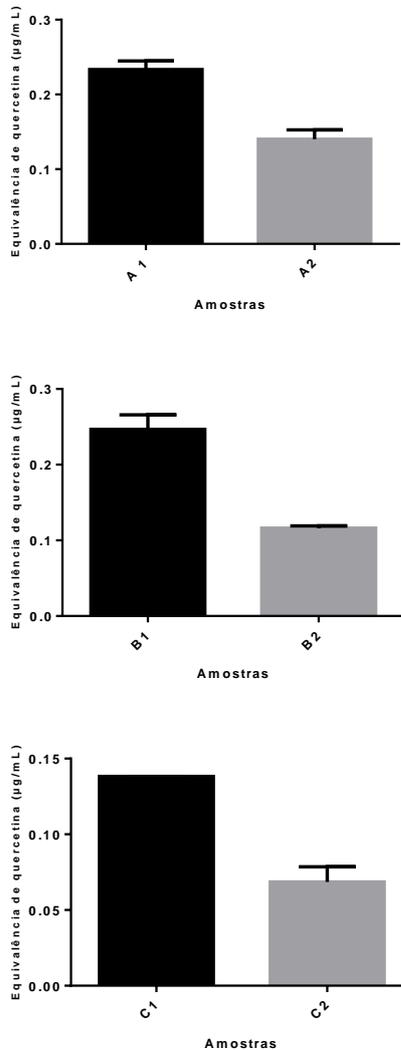


Figura 07: Atividade antioxidante avaliada pelo método de inibição da formação do complexo fosfomolibdênio dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. Comparando o tempo de preparo de cada chá por Wilcoxon. Os dados representam mediana das triplicatas \pm intervalo interquartil. Não foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras analisadas. As letras A, B e C representam lote/marca distintos dos produtos adquiridos contendo a droga vegetal de *H. sabdariffa*. O número "1" posterior as letras A, B e C refere-se aos chás avaliados depois de uma hora de preparo e o número "2" refere-se aos chás avaliados depois de doze horas de preparo.

4.1.2 Padrão Ácido Ascórbico ($C_6H_8O_6$).

A partir da regressão linear obteve-se a curva analítica do padrão ácido ascórbico ($y = 4,301x - 0,02141$, $r = 0,9982$) (figura 08).

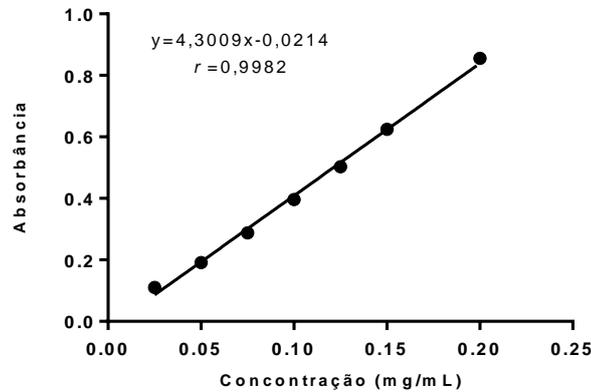


Figura 08: Curva Padrão da atividade antioxidante do ácido ascórbico pelo método de inibição da formação do complexo fosfomolibdênio.

A partir da equação, podemos correlacionar o quanto a amostra é equivalente ao padrão e com os resultados obtidos (Tabela 2) foi aplicado o teste de comparação *Kruskal- Wallis -Dunn's*. Esse teste foi escolhido pois possibilita, com os dados assimétricos de forma não paramétrica calcular quem da população em destaque é semelhante, sendo verificado semelhanças entre as marcas com o padrão (Figura 09). Além disso, foi verificado que as marcas entre si também não demonstraram diferenças significativas entre elas (Figura 10).

Tabela 2 - Atividade antioxidante avaliada pelo método de inibição da formação do complexo de fosfomolibdênio dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L.

Amostra	Concentração µg/ml	Média ± desvio padrão (3,9QE/µg);
A1	400	0,123 ± 0,003
B1	400	0,127 ± 0,005
C1	400	0,090 ± 0,000
A2	400	0,091 ± 0,003
B2	400	0,083 ± 0,000
C2	400	0,082 ± 0,028

Os dados representam a média das triplicatas dos valores de equivalência ± desvio Padrão da quantidade equivalente do padrão ácido ascórbico (QE) de 3,9 µg das flores. As letras A, B e C representam lote/marca dos produtos adquiridos contendo a droga vegetal de *H. sabdariffa*. O número “1” posterior as letras A, B e C refere-se aos chás avaliados depois de uma hora de preparo e o número “2” refere-se aos chás avaliados depois de doze horas de preparo

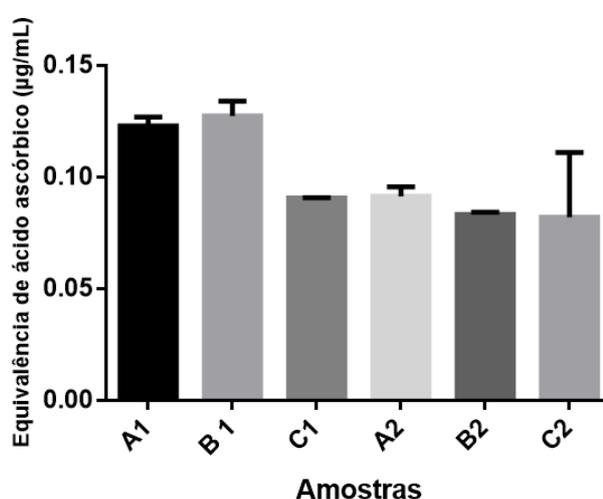


Figura 09: Atividade antioxidante avaliada pelo método de inibição do complexo de fosfomolibdênio dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. *Kruskal-Wallis – Dunn’s*. As letras A, B e C representam lote/marca dos produtos adquiridos contendo a droga vegetal de *H. sabdariffa*. Os dados representam médiana das triplicatas ± intervalo interquartil. Não foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras analisadas. O número “1” posterior as letras A,B e C refere-se aos chás avaliados depois de uma hora de preparo e o número “2” refere-se aos chás avaliados depois de doze horas de preparo.

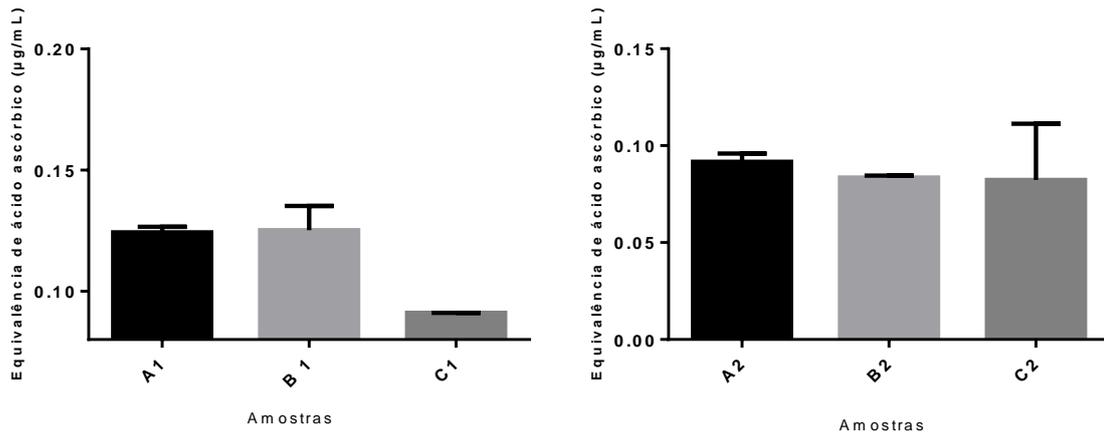


Figura 10: Atividade antioxidante avaliada pelo método de inibição da formação do complexo fosfomolibdênio dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. *Kruskal-Wallis – Dunn's*. Os dados representam médiana das triplicatas \pm intervalo interquartil. Não foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras analisadas. As letras A, B e C representam lote/marca distintos dos produtos adquiridos contendo a droga vegetal de *H. sabdariffa*. O número “1” posterior as letras referem-se aos chás avaliados depois de uma hora de preparo e o número “2” refere-se aos chás avaliados depois de doze horas de preparo.

Outro ponto a ser verificado é que ao decorrer do tempo de preparo, houve decréscimo da atividade antioxidante nos chás de 1 hora para 12 horas, na amostra A se obteve decréscimo (26%), já na amostra B um decréscimo (35%) e na amostra C o menor acréscimo (10%), entretanto através do método de comparação por *Wilcoxon*, não houve diferenças significativas estatisticamente, logo o chá mesmo após 12 horas de preparo é observado atividade antioxidante (Figura 11). Esses resultados são de grande ajuda para elucidar, como o chá se comporta no decorrer do preparo até a hora de consumo, os valores de equivalência em comparação ao padrão ácido ascórbico demonstrados na tabela 2, se mostraram satisfatórios. Através desses resultados, pode-se inferir que o usuário que faz o uso do chá no decorrer do dia, consegue adquirir as propriedades antioxidantes.

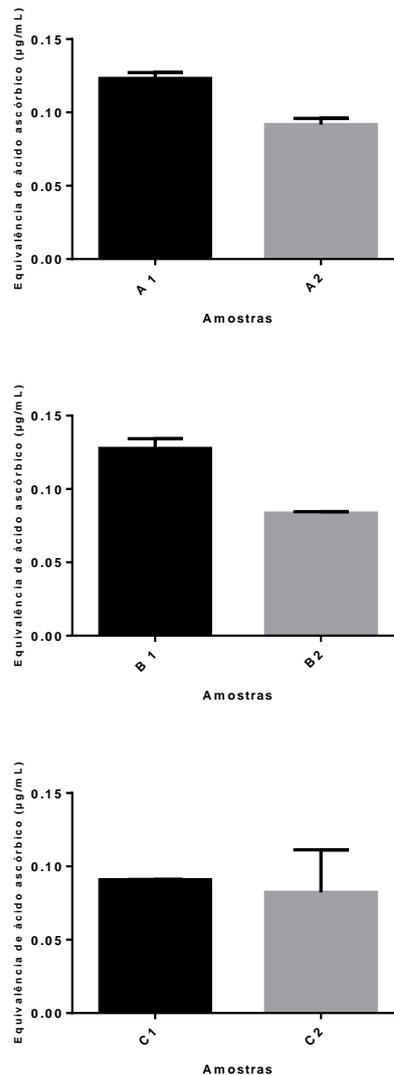


Figura 11: Atividade antioxidante avaliada pelo método de inibição da formação do complexo fosfomolibdênio dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. Comparando o tempo de preparo de cada chá por Wilcoxon. Os dados representam mediana das triplicatas \pm intervalo interquartil. Não foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras analisadas. As letras A, B e C representam lote/marca dos produtos adquiridos contendo a droga vegetal de *H. sabdariffa*. O número “1” posterior as letras refere-se aos chás avaliados depois de uma hora de preparo e o número “2” aos chás avaliados depois de doze horas de preparo.

4.2 Ensaio ORAC (Oxygen Radical Absorbance Capacity)

O método tem como mecanismo a degradação da mistura fluorescente misturada à radicais livres formando o radical peroxil (PRIOR *et al*, 2015). Os extratos demonstram boa capacidade de absorção dos radicais livres, sendo capaz de proteger a molécula fluorescente. A análise foi realizada usando os valores de

inibição para calcular o IC₅₀ (concentração inibitória de 50% da atividade máxima), os valores de IC₅₀ foram obtidos através de regressão linear. (Tabela 3). Verificando os valores de IC₅₀, percebemos que em relação ao padrão os valores das amostras se encontram elevados, significando um valor baixo da atividade antioxidante. Se olharmos na literatura é relatado de IC₅₀ baixos, essa diferença é possivelmente devido a diferenças de plantio, solo e extração (ARROYO *et al.*, 2011).

Tabela 3- Atividade antioxidante avaliada por ensaio ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. e do padrão AA - Ácido Ascórbico.

Amostra	IC ₅₀ µg/mL ± DP ;
AA	4,73 ± 0,001
A1	57,69 ± 0,055
B1	60,07 ± 0,081
C1	57,27 ± 0,168
A2	60,05 ± 0,076
B2	60,99 ± 0,177
C2	55,97 ± 0,066

Os dados representam a média das triplicatas dos valores de IC₅₀ ± desvio padrão (DP). As letras A, B e C representam lote/marca dos produtos adquiridos contendo a droga vegetal de *H. sabdariffa*. O número "1" posterior as letras A, B e C refere-se aos chás avaliados depois de uma hora de preparo e o número "2" refere-se aos chás avaliados depois de doze horas de preparo.

Através do teste de comparação *Kruskal- Wallis -Dunn's*, no qual foi verificada diferenças significativas entre o padrão Ácido Ascórbico (IC₅₀: 4,73 µg/mL), com as amostras A2 (IC₅₀: 60,05 µg/mL), B1(IC₅₀: 60,07 µg/mL) e B2(IC₅₀: 60,99 µg/mL) (Figura 12). Além disso, foi observado que as marcas entre si também demonstraram diferenças significativas entre elas, a amostra B1(IC₅₀: 60,07 µg/mL) se demonstrou diferente da C1(IC₅₀: 57,27 µg/mL), além da B2 (IC₅₀: 60,99 µg/mL) mostrou-se diferente da C2 (IC₅₀: 55,97 µg/mL). Desse modo, através da análise estatística podemos observar diferenças significativas entre as marcas B e C (Figura 13), essa diferença pode ser devido a diferença de plantio (MARÍN *et al.*, 2015), como também o modo de que como é realizado o processo de desidratação da planta, o processo de embalagem e de como esse material é transportado até chegar ao consumidor.

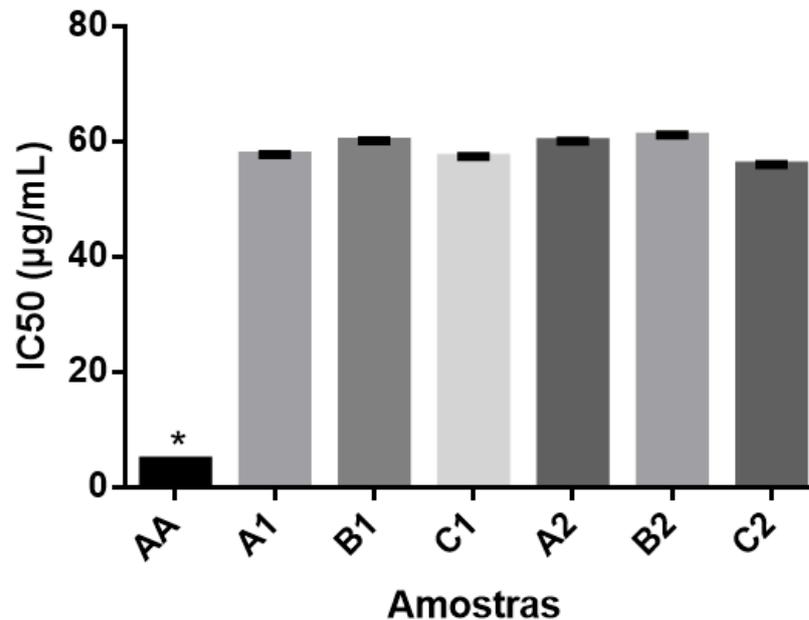


Figura 12: Atividade antioxidante avaliada por ensaio *ORAC* (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. e do padrão AA (ácido ascórbico). *Kruskal-Wallis – Dunn's*. Os dados representam a mediana das triplicatas \pm intervalo interquartil. Foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras analisadas. *AA mostrou-se diferente de B1, A2 e B2. As letras A, B e C representam lote/marca distintos dos produtos adquiridos contendo a droga vegetal de *H. sabdariffa*. O número "1" posterior as letras refere-se aos chás avaliados depois de uma hora de preparo e o número "2" refere-se aos chás avaliados depois de doze horas de preparo.

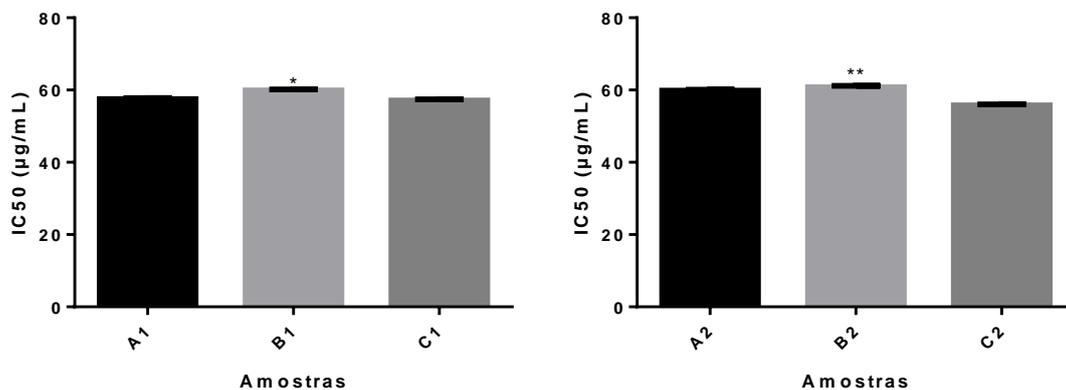


Figura 13: Atividade antioxidante avaliada por ensaio *ORAC* (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. *Kruskal-Wallis – Dunn's*. Os dados representam a mediana das triplicatas \pm intervalo interquartil. Foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras analisadas. *demonstrou-se diferente de C1. **demonstrou-se diferente de C2. As letras A, B e C representam lote/marca distintos dos produtos adquiridos contendo a droga vegetal de *H. sabdariffa*. O número "1" posterior as letras referem-se aos

chás avaliados depois de uma hora de preparo e o número “2” refere-se aos chás avaliados depois de doze horas de preparo.

Outro ponto a ser observado foi a que ao decorrer do tempo de preparo, não houve decréscimo da atividade antioxidante aparente nos chás de 1 hora para 12 horas, para a análise, utilizando o teste de *Wilcoxon*, foi observado não haver diferenças significativas. Logo o chá mesmo após 12 horas de preparo mantém a atividade antioxidante (Figura 14). O resultado obtido pode ser comparado ao estudo de 2002, no qual o extrato aquoso se mostrou estável ao período de armazenamento (TSAI, P. *et al*,2002). Assim, através dos valores de IC_{50} (tabela 03) podemos confirmar que o chá possui estabilidade com até 12 horas de preparo.

Entretanto, podemos observar que pelo método *ORAC* que algumas amostras de chá não tiveram atividade semelhante ao padrão utilizado, além de demonstrar haver diferenças significativas na atividade antioxidante em duas marcas analisadas no Distrito Federal.

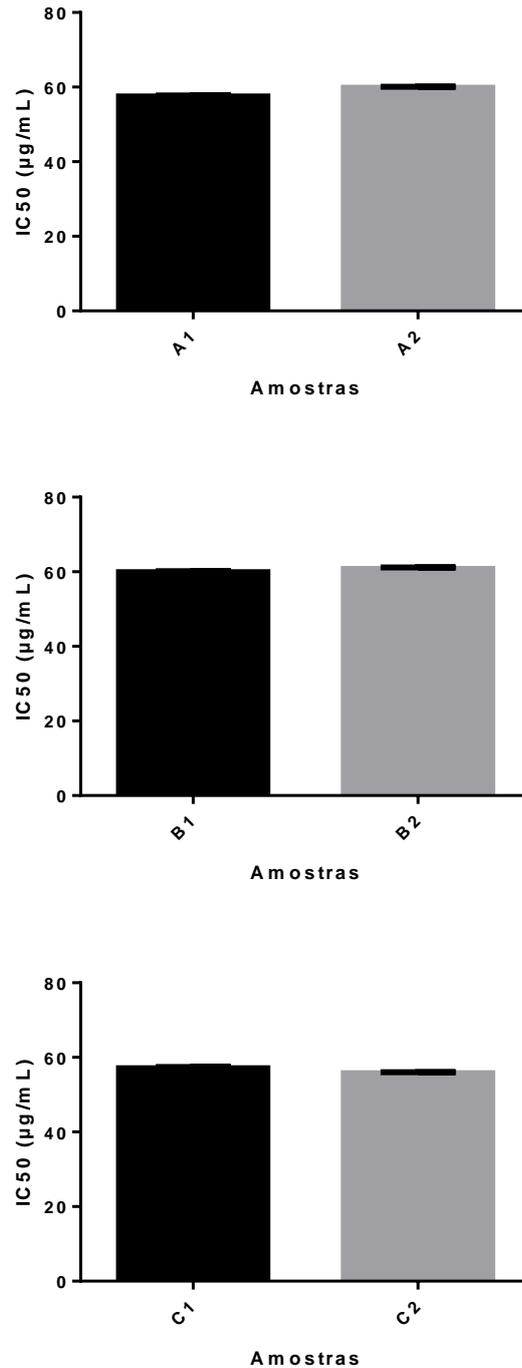


Figura 14: Atividade antioxidante avaliada por ensaio ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. Comparação da atividade antioxidante em relação ao tempo de preparo de cada chá por *Wilcoxon test*. Os dados representam a mediana das triplicatas \pm intervalo interquartil. Não foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras analisadas. As letras A, B e C representam lote/marca distintos dos produtos adquiridos contendo a droga vegetal de *H. sabdariffa*. O número “1” posterior as letras refere-se aos chás avaliados depois de uma hora de preparo e o número “2” refere-se aos chás avaliados depois de doze horas de preparo.

4.3 Peroxidação Lipídica:

O acúmulo dos produtos de degradação é uma das principais causas das disfunções celulares. No presente estudo, os lipídeos foram os alvos principais do ataque oxidativo, contribuindo para a produção de produtos de degradação. Os extratos demonstram capacidade de neutralizar os radicais livres (SOTO *et al.*, 2016). Chegamos a essa conclusão com a análise realizada usando os valores de inibição para calcular o IC₅₀ (concentração inibitória de 50%), esses valores foram obtidos através de regressão linear e plotados graficamente no programa GraphPad Prism® Version 6.0. Por meio desses resultados observamos que o chá teve redução dos produtos de degradação com níveis baixos de IC₅₀ (Tabela 4).

Tabela 4- Atividade antioxidante avaliada por peroxidação lipídica dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. e do padrão BHT (hidroxitolueno butilado).

Amostra	IC₅₀ µg/mL ± DP;
BHT	1,87 ± 0,007
A1	1,84 ± 0,082
B1	1,31 ± 0,073
C1	2,68 ± 0,070
A2	1,83 ± 0,047
B2	1,68 ± 0,024
C2	2,81 ± 0,091

Os dados representam a média das triplicatas dos valores de IC₅₀ ± desvio padrão (DP). As letras A, B e C representam lote/marca dos produtos adquiridos contendo a droga vegetal de *H. sabdariffa*. O número “1” posterior as letras A, B e C refere-se aos chás avaliados depois de uma hora de preparo e o número “2” refere-se aos chás avaliados depois de doze horas de preparo.

O teste de comparação Kruskal- Wallis -Dunn's, realizou a verificação de diferenças significativas com o Padrão BHT (IC₅₀: 1,87 µg/mL), (hidroxitolueno butilado) (Figura 15), as marcas entre si demonstraram diferenças significativas entre elas, a amostra B1 (IC₅₀: 1,31 µg/mL), é diferente da C1 (IC₅₀: 2,68 µg/mL), além da B2(IC₅₀: 1,68 µg/mL), se mostrar diferente da C2 (IC₅₀: 2,81 µg/mL). Dessa forma, analisando os dados observa-se diferenças significativas entre as marcas B e C (Figura 16), essa diferença pode ser devido a diferença de plantio da planta (MARÍN *et al*, 2015), como também o modo de que como é realizado o processo de

desidratação da planta, o processo de embalagem e de como esse material é transportado até chegar ao consumidor.

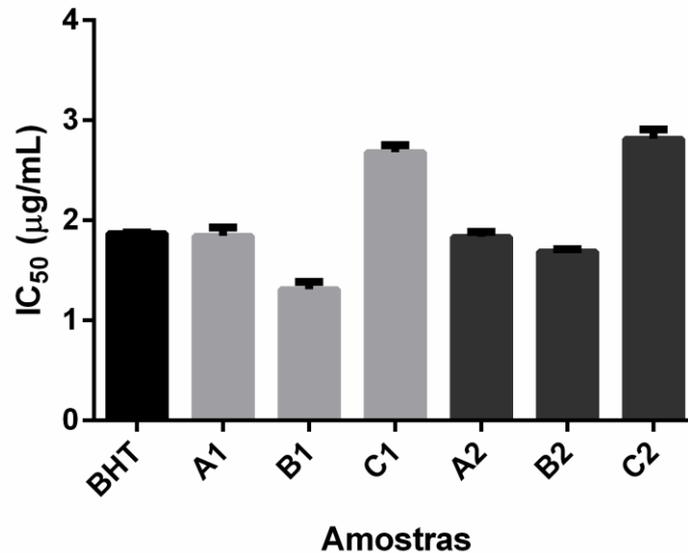


Figura 15: Atividade antioxidante avaliada por peroxidação lipídica dos chás preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. e do padrão BHT (hidroxitolueno butilado) por *Kruskal-Wallis – Dunn's*. As letras A, B e C representam lote/marca dos produtos adquiridos contendo a droga vegetal de *H. sabdariffa*. Os dados representam a mediana das triplicatas \pm intervalo interquartil. Não foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entres as amostras analisadas. O número “1” posterior as letras referem-se aos chás avaliados depois de uma hora de preparo e o número “2” posterior as letras refere-se aos chás avaliados depois de doze horas de preparo.

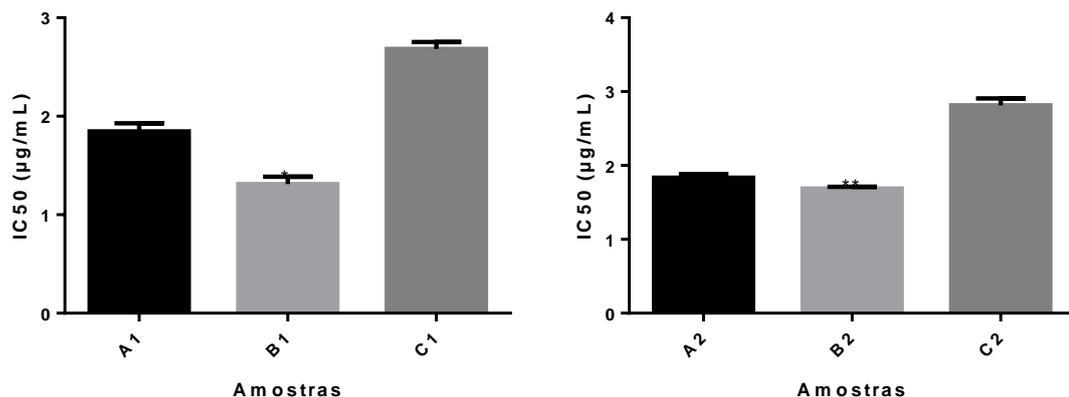


Figura 16: Atividade antioxidante avaliada por peroxidação lipídica dos chás de três marcas distintas (A, B e C) preparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. *Kruskal-Wallis – Dunn's*. Os dados representam a mediana das triplicatas \pm intervalo interquartil. Foram detectadas

diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras analisadas. *B1 demonstrou-se diferente de C1. **mostrou-se diferente de C2. As letras A, B e C representam lote/marca distintos dos produtos adquiridos contendo a droga vegetal de *H. sabdariffa*. O número “1” posterior as letras referem-se aos chás avaliados depois de uma hora de preparo e o número “2” posterior as letras refere-se aos chás avaliados depois de doze horas de preparo.

Outro ponto a ser observado é que ao decorrer do tempo de preparo, não houve decréscimo aparente da atividade antioxidante nos chás de 1 hora para 12 horas, através do método de comparação por Wilcoxon, não foi observado diferenças significativas estatisticamente, logo o chá mesmo após 12 horas de preparo é observado atividade antioxidante. (Figura 17). Assim, obtemos que mesmo com diferentes métodos o chá continua tendo atividade, os valores de IC_{50} do BHT e das amostras demonstrados na tabela 4, se mostraram satisfatórios.

Assim, pelo método de peroxidação lipídica algumas amostras de chá tiveram atividade semelhante ao padrão utilizado, além de demonstrar diferenças significativas na atividade antioxidante em duas marcas disponíveis no Distrito Federal. Todavia, não houve diferenças significativas no período de 1 hora e 12 horas. O que é um fator de grande importância para o entendimento do consumidor, que realiza o consumo do chá no decorrer do dia.

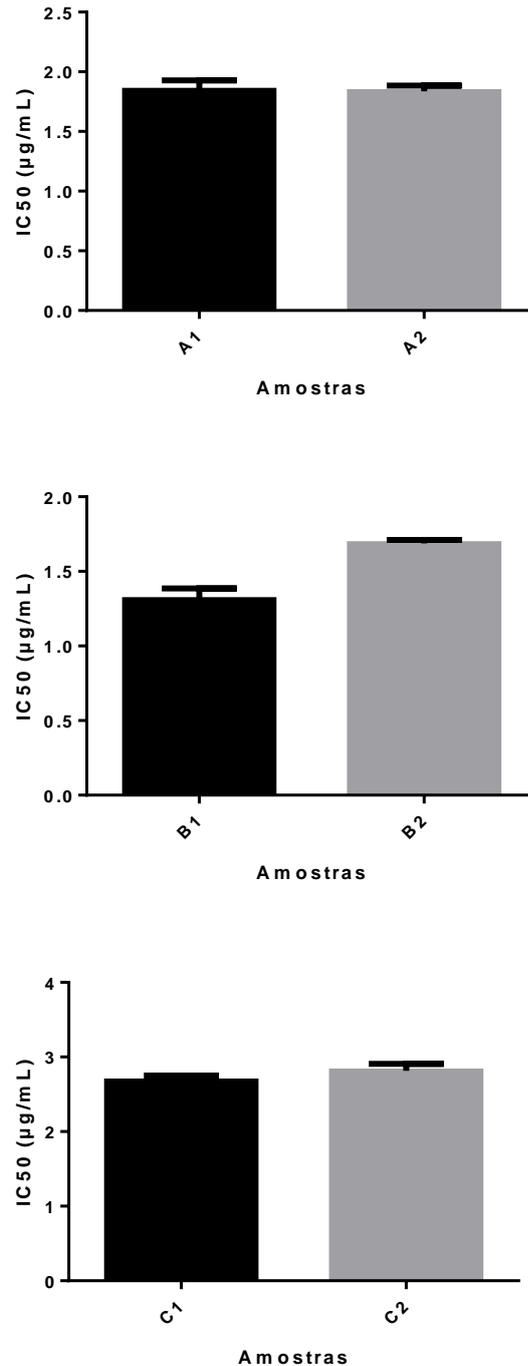


Figura 17: Atividade antioxidante avaliada por peroxidação lipídica dos chás reparados a partir das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. Comparação da atividade antioxidante em relação ao tempo de preparo de cada chá por *Wilcoxon test*. Os dados representam a mediana das triplicatas \pm intervalo interquartis. Não foram detectadas diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras analisadas. As letras A, B e C representam lote/marca dos produtos adquiridos contendo a droga vegetal de *H. sabdariffa*. O número "1" posterior as letras referem-se aos chás avaliados depois de uma hora de preparo e o número "2" refere-se aos chás avaliados depois de doze horas de preparo.

Através desses resultados podemos observar nos três testes que o tempo de preparo de até 12 horas, não interfere na atividade antioxidante do chá, havendo semelhanças entre eles. As diferenças de resultados obtidos, sobre a semelhança das marcas estudadas, podem ser explicadas através da literatura na qual é observado que alimentos nas suas várias composições químicas, podem influenciar no estudo (YERDI *et al*, 2007), sendo necessário assim três testes distintos nos quais dois apresentaram diferença significativa entre as marcas B e C. Logo, podemos inferir que há diferenças entre duas marcas de chá comercializadas, essas diferenças podem estar relacionadas aos níveis de substâncias, que variam de acordo com o tratamento dado ao plantio da planta de origem (MARÍN *et al*, 2015), como também o modo de que como é realizado o processo de desidratação da planta, o processo de embalagem e de como esse material é transportado até chegar ao consumidor. Outro fator importante a ser abordado é a venda irregular de chás que não possuem embalagem própria, nem empresa com CNPJ disponível. Pondo em risco a saúde da população, que não consegue ter um produto que apresentem qualidade, segurança e efetividade.

A comprovação da continuação da atividade oxidante em até 12 horas de preparo, apresenta a *H. sabdariffa* como fonte natural estável para a obtenção de nutrientes, sendo necessário mais estudo que permitam uma maior compreensão dos efeitos do chá e sua segurança em humanos (ANJOS *et al*, 2017), além de observar como o chá pode interagir com outros fármacos. Principalmente pelo fato de que o chá é visto na regulamentação como alimento, sendo encontrado principalmente em feiras, supermercados e lojas de suplementos alimentares o que causa uma falsa percepção de que fazer o uso do chá desenfreadamente não acarretará possíveis danos como o comprometimento da função hepática e do sistema reprodutor masculino (CASTRO, 2003).

Nesse quadro, podemos ver que se deve aprimorar os estudos nesse campo, visando a qualidade de vida da população. Devido ao fato de encontrarmos na literatura divergências sobre o potencial de interação do extrato aquoso da *H. sabdariffa*. Segundo o estudo de 2006, a atividade do extrato aquoso da planta não modulou a atividade do citocromo P₄₅₀ (Prommetta *et al*, 2006). Entretanto outro

estudo realizado em 2013, demonstra que o extrato etanólico possui inibição de nove isoformas do citocromo P₄₅₀, logo, o extrato aquoso poderá ter interação mesmo sendo em menor intensidade. Sua administração poderá acarretar então a inibição do fármaco pelo mecanismo de primeira passagem (JOHNSON *et al.*, 2013).

Assim sendo, o uso devido aos seus vários benefícios, pode ser interessante para o controle de doenças crônicas, entretanto o uso de múltiplos medicamentos em algumas patologias, como exemplo o efeito antioxidante envolvido em doenças cardiovasculares (SOTO *et al.*, 2016). Poderá acarretar em uma administração errônea, podendo trazer interações aos medicamentos em uso.

No caso do uso da planta para o tratamento da aterosclerose (TCHOUYA *et al.*, 2016), o consumidor deverá ter cuidado, devido ao fato de que o chá com demonstrou interação com o diclofenaco. A interação tem como característica a redução da excreção do fármaco, o que pode levar a um aumento ou decaimento da faixa terapêutica ideal (FAKEYE *et al.*, 2007).

Assim sendo, a inclusão do chá de *H. sabdariffa* como fitoterápico na legislação possibilitará mais estudos sobre o assunto, além permitir a inclusão na RDC ° 26, de 13 de maio de 2014, que preconiza sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos (BRASIL, 2014).

5 Conclusão

Através dos ensaios de inibição da formação do complexo fosfomolibdênio, ORAC e peroxidação lipídica foi possível verificar a atividade antioxidante nas três marcas de chás contendo as flores de *Hibiscus sabdariffa* L. O estudo demonstrou-se efetivo na avaliação da atividade antioxidante dos chás, sendo obtido bons valores de sua ação mesmo após as 12 horas de preparo. O uso de três tipos de métodos diferentes entre si, possibilitou a visão mais segura dos resultados, sendo observada diferenças significativas na semelhança entre as marcas do mercado, confirmando que cada fabricante possui um teor de compostos químicos diferenciados, que proporcionam a atividade antioxidante do chá.

Podemos concluir que o chá de *H. sabdariffa* se demonstra possivelmente efetivo na prevenção e controle de inúmeras doenças existente em nossa população, sendo um fator de escolha entre a população para uma alimentação saudável e um bom envelhecimento devido sua atividade antioxidante. Entretanto a falta de orientações sobre o bom cultivo da planta, de como deve ser sua preparação e como deverá ser realizado o consumo de forma segura faz com que, o usuário fique sem recursos para o uso racional. Logo, a utilização segura do chá é necessária, através de mais estudos sobre os assuntos, para que se acabe com as divergências existentes sobre o processo de interação.

6 Referência bibliográfica

- ADEYEMI.O. D, *et al.*: Anti-hepatotoxic activities of *Hibiscus sabdariffa* L. in animal model of streptozotocin diabetes-induced liver damage. BMC Complementary and Alternative Medicine 14:277, 2014.
- ALI. B. H, *et al.*: Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A Review. Phytotherapy research.Phytother. Res. 19, 369–375,2005.
- ANJOS.D. C. J, *et al.*: Estudo *in vitro* da atividade antioxidante de *Hibiscus Sabdariffa* L. Revista Saúde UniToledo, Araçatuba, SP, v. 01, n. 01, p. 20-30,2017.
- ARROYO.F. S. *et al.*: Quantification of the polyphenolic fraction and *in vitro* antioxidant and *in vivo* anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. FRIN, v. 44, n. 5, p. 1490–1495, 2011.
- BAATARTSOG.T *et al.*: High antiviral effects of *hibiscus* tea extract on the H5 subtypes of low and highly pathogenic avian influenza viruses. Doi: 10.1292/jvms.16-0124; J. Vet. Med. Sci. 78(9): 1405–1411, 2016.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos. Brasília, 2006. 60 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos . – Brasília : Ministério da Saúde, 2006.148 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).
- BRASIL, Resolução RDC nº 277, de 22 de setembro de 2005 com o objetivo de definir ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção à saúde da população;
- BRASIL, Resolução RDC Nº 26, De 13 De Maio De 2014- Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.

- BORGES.L.L,*et al.* Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. Enciclopedia Biosfera, Centro Científico Conhecer, vol.7, n.12; 2011.
- CASTRO.N.E.A, Época de plantio e método de colheita para ,maximização da produção de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L., Lavras:UFLA,2003.
- COITINHO.D. C. *et al* ;Recomendações de Alimentação e Nutrição Saudável para a População Brasileira. p. 0–5, [s.d.], jun, 2000.
- EMBRAPA,Protocolos de análise para polpa de açaí: um guia prático de consulta./Tatiane Regina Albarici, Danieli Melo de Freitas, José Dalton Cruz Pessoa. São Carlos, SP: Embrapa Instrumentação Agropecuária, 2009.p.48.
- FAKEYE.T. O. *et al.* Effects of Water Extract of *Hibiscus sabdariffa*, Linn (Malvaceae) “ Roselle ” on Excretion of a Diclofenac Formulation. v. 98, n. September 2006, p. 96–98, 2007.
- FREITAS.M.N,*et al.* Avaliação fitoquímica e determinação de minerais em amostras de *Hibiscus sabdariffa* L.(vinagreira).Cad.Pesq.,São Luis,v.20,n.3,set./dez, 2013.
- GUARDIOLA, S;*et al.*Therapeutic potential of Hibiscus sabdariffa : A review of the scientific evidence & . Medicina Intensiva (English Edition), v. 61, n. 5, p. 274–295, 2014.
- IYARE.E. *et al.* Mechanism of the decreased food consumption and weight gain in rats following consumption of aqueous extract of the calyx of *Hibiscus sabdariffa* during pregnancy. v. 3, n. 3, p. 185–188, 2010.
- JOHNSON.S. S. *et al.* in vitro inhibitory activities of the extract of hibiscus sabdariffa l.(family malvaceae) on selected cytochrome p450 isoforms. v. 10, p. 533–540, 2013
- LIN.H. *et al.* Journal of Traditional and Complementary. Medicine Antioxidant effects of 14 Chinese traditional medicinal herbs against human low-density lipoprotein oxidation. Journal of Traditional Chinese Medical Sciences, v. 5, n. 1, p. 51–55, 2015.
- MARÍN.A.L. S, *et al.* Extração, indentificação e quantificação de cafeína em chá composto(*Camellia sinensis* e *Hibiscus sabdariffa* L.) por cromatografia líquida de alta efeciência (CLAE).Syn.scy.UTFPR,Pato Branco,v.10,n.1,p.59-66,2015.

- MICUCCI. M. *et al*: Cardiac and Vascular Synergic Protective Effect of *Olea europea* L. Leaves and *Hibiscus sabdariffa* L. Flower Extracts. *Oxidative. Medicine and Cellular Longevity*, volume 2015, Article ID 318125, 2015
- MIGUEL.G.; *et al*. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespititius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. *Food Chemistry*. 86, 183-188. 2004.
- MONTELES.R. *et al*. Plantas medicinais em um quilombo maranhense: uma perspectiva etnobotânica. *Revista de Biologia e ciências da terra*. Volume 7, número 2, 2007.
- NUNES.P.S, *et al*: Compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante em chá de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.). XXIII CONGRESSO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFLA, 27 de outubro à 01 de novembro de 2014.
- PRENESTI.E. *et al*. Food Chemistry Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. v. 100, p. 433–438, 2007.
- PRIETO. P; *et al*. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: Specific application to the determination of vitamin E. *Analytical biochemistry*, 269 (2): 337-41, 1999
- PRIOR.R. L; *et al*. Standardized methods for the determination of antioxidant capacity and phenolics in foods and dietary supplements. *Journal of agricultural and food chemistry*, 53 (10): 4290-302, 2005
- Prommetta.P, *et al*. Aqueous extract of the calyces of *Hibiscus subdariffa* Linn.: effects on hepatic cytochrome P450 and subacute toxicity in rats. *Thai J. Pharm. Sci.*v. 30 ,p.8-18,2006.
- Ritter, C. Estresse oxidativo e desenvolvimento de doenças inflamatórias agudas : possível papel terapêutico de antioxidantes. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Instituto de Ciências Básicas da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica. Doutorado.2007.
- ROCHA .D.C. I. *et al*. *Hibiscus sabdariffa* L. - A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*, v. 165, p. 424–443, 2014.

- RAMOS D.D. *et al* , Atividade antioxidante de Hibiscus sabdariffa L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica. Ciência Rural, Santa Maria. v.41,n.8,p.1331-1336,ago 2011.
- ROSA.S.E. Características nutricionais e fotoquímicas em diferentes preparações e apresentações de Hibiscus Sabdariffa L. (hibisco, vinagreira, rosela, quiabo-de-angola, caruru-daguiné) Malvaceae. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e tecnologia de alimentos, graduação em nutrição. Novembro,2013.
- SN. F.*et al.*: Phenolic compounds of Hibiscus sabdariffa and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. Braz. J. Biol., vol. 75, no. 1, p. 69-76, Braz, 2015.
- SOBOTA.J.F *et al*; Perfil físico-químico e atividade antioxidante do cálice da espécie Hibiscus sabdariffa L. a partir do extrato aquoso e alcoólico obtidos por infusão e decocto. Revista Fitos, Rio de Janeiro, Vol, 10(1), 1-93, Jan-Mar 2016
- SOTO.M. E. *et al.* Infusion of Hibiscus sabdariffa L. Modulates Oxidative Stress in Patients with Marfan Syndrome. Mediators of Inflammation, v. 2016, p. 1–12, 2016.
- TCHOUYAG. R. F.; *et al.* Comparative study of the anti-oxidant activity of the total polyphenols extracted from *Hibiscus Sabdariffa L*, *Glycine max L . Merr* , yellow tea and red wine through reaction with DPPH free radicals. p. 1–8, 2016.
- TSAI.P. *et al.* Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (Hibiscus Sabdariffa L .) extract. v. 35, p. 351–356, 2002.
- UYEDA.*et al.* Hibisco e o processo de emagrecimento: uma revisão da literatura. Saúde em Foco, Edição nº: 07/Ano: 2015.
- VICTOR.I. E.; *et al*; Efficacy of Hibiscus sabdariffa and Telfairia occidentalis in the attenuation of CCl4-mediated oxidative stress. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine, v. 7, n. S1, p. S321–S326, 2014.

- VIZZOITO.M.; *et al.* Hibisco: do uso ornamental ao medicinal. 2008. EMBRAPA Clima Temperado. Disponível em: [em <www.embrapa.br>](http://www.embrapa.br) Acesso em 11 de maio de 2017
- VIZZOTTO.M.;*et al.* Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante em Cálices de Hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.). EMBRAPA Clima Temperado, outubro de 2009. Disponível em [<www.embrapa.br>](http://www.embrapa.br) Acesso em 11 de maio de 2017.
- YAMAMOTO.T. N; *et al.* Desenvolvimento de (*Hibiscus sabdariffa* L.) Cultivada em diferentes substratos. Revista Brasileira de Biociências, Porto Alegre, V.5, supl.2, p.771-773, jul.2007.
- YERDI.S. O. G. S. Á. *et al.* Dietary Fiber Content and Associated Antioxidant Compounds in Roselle Flower (*Hibiscus sabdariffa* L .) Beverage. p. 7886–7890, 2007.