

AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE *IN VITRO* E DETERMINAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS EM DIFERENTES SISTEMAS DE EXTRAÇÃO EM AMOSTRAS DE HIBISCO (*Hibiscus sabdariffa*)

NEHRING, P.¹, GONZAGA, L. V.¹, SERAGLIO, S. K. T.¹, SCHULZ, M.¹, COSTA, A. C. O.¹, FETT, R.¹

¹ Universidade Federal de Santa Catarina, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos
E-mail para contato: priscilanehring@yahoo.com.br

RESUMO – O hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) possui origem na Ásia, muito cultivado no Brasil e explorado pela medicina popular. A flor do hibisco e suas sementes apresentam um grande potencial a ser explorado visto a presença de compostos com propriedades bioativas. O presente trabalho buscou comparar a eficiência de diferentes sistemas de extração de compostos antioxidantes através da quantificação de compostos fenólicos totais (FT) e da determinação da atividade antioxidante *in vitro* (AA) em extratos de flor de hibisco *in natura*, flor de hibisco desidratada e sementes de hibisco desidratada, avaliando sistemas de solventes (acetona : água 80% v/v e metanol contendo 0,1% de HCl) e mecanismos de extração (ultrassom e geladeira com agitação magnética). A determinação de FT foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu e a AA pelos métodos de captura de radicais livres DPPH e de redução do ferro (FRAP). Para amostras da flor *in natura*, os resultados não diferiram estatisticamente para FT e AA em ambos os mecanismos de extração, independentemente do solvente aplicado. Para as amostras de flor desidratada e semente, pode-se indicar a acetona 80% como o solvente mais eficiente independente do mecanismo de extração para FT e AA. Notou-se ainda que a flor desidratada apresentou os maiores valores de FT e AA em relação as demais amostras. Portanto, para todas as amostras o solvente mais indicado para determinação de FT e AA foi a acetona 80%, não havendo distinção entre os mecanismos de extração.

1. INTRODUÇÃO

O grande interesse em antioxidantes naturais a partir de fontes vegetais tem crescido extensivamente nos últimos anos, principalmente por compostos que podem estar relacionados com a prevenção de doenças. O *Hibiscus sabdariffa*, conhecido por hibisco, apresenta-se como uma planta com alta perspectiva para produtos nutracêuticos, devido à presença de componentes com atividade antioxidante, como os compostos fenólicos (PATEL, 2014).

O hibisco é uma planta pertencente a família *Malvaceae*, descrita como uma planta anual, (AJAY *et al.*, 2007; GUARDIOLA; MACH, 2014; PATEL, 2014; ROCHA *et al.*, 2014; SINDI *et al.*, 2014) espessa, atingindo uma altura de até 2,4 m (ALARCON-AGUILAR

et al., 2007; IYARE *et al.*, 2010; OKOKO; ERE, 2012; SINDI *et al.*, 2014). Planta tropical nativa na Índia e Malásia, o hibisco cresce amplamente nas regiões tropicais e subtropicais de ambos os hemisférios e tornou-se naturalizado em várias regiões das Américas (ALARCON-AGUILAR *et al.*, 2007; RAMÍREZ-RODRIGUES *et al.*, 2012).

Muito popular na África Ocidental e Sul da Ásia, as flores do hibisco são utilizadas para fazer chás, apresentando um sabor amargo com aroma característico, sendo também comercializadas sob a forma de geleias, bebidas (LIN *et al.*, 2012; AHMED; ABOZED, 2014; PATEL, 2014; SINDI *et al.*, 2014), molhos, compotas, doces, entre outros. O extrato de hibisco quando consumido com moderação não produz efeitos tóxicos e é seguro. Introduzido no setor de alimentos, o hibisco vem sendo utilizado como fibra dietética, antioxidante e corante (PATEL, 2014; DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014).

Em um número crescente de países, o *Hibiscus sabdariffa* tem sido utilizado extensivamente na medicina popular para o tratamento de várias doenças (ALI *et al.*, 2005). Recentemente, estudos mostram que os extratos de hibisco possuem propriedades que podem desempenhar papel fundamental na prevenção de doenças crônicas, como hipertensão, redução de doença hepática, doenças cardiovasculares, aterosclerose e diabetes. Outros estudos, mostram a redução do colesterol, podendo atuar como anticancerígeno, antimutagênico e antiproliferativo (SINDI *et al.*, 2014).

Estudos sobre a caracterização completa dos componentes com atividade antioxidante e ensaios clínicos adequados, podem ampliar o âmbito de aplicações do hibisco. O uso adequado desta planta pode promover o desenvolvimento de uma ampla linha de alimentos funcionais benéficos à saúde (PATEL, 2014).

Portanto, o presente trabalho visa comparar a eficiência de diferentes sistemas de extração de compostos com capacidade antioxidante através da quantificação de compostos fenólicos totais (FT) e da determinação da atividade antioxidante *in vitro* (AA) em extratos de flor de hibisco *in natura* (FI), flor de hibisco desidratada (FD) e sementes de hibisco desidratadas (SD), avaliando sistemas de solventes (acetona 80%; metanol 0,1% HCl) e mecanismos de extração (1 hora em ultrassom; 1 hora com agitação magnética em geladeira).

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Preparo da Amostra

As flores com sementes de hibisco foram coletadas em Florianópolis-SC, sendo acondicionadas em sacos plásticos e transportadas em caixa isotérmica. Após o recebimento no laboratório, parte das amostras foi desidratada em estufa com circulação forçada de ar (modelo Fabbe 170, São Paulo, Brasil) em temperatura de 60 °C, durante 12 horas. As flores desidratadas, flores *in natura* e sementes desidratadas foram trituradas separadamente em moinho de bancada (IKA modelo A49, SP, Brasil) e armazenadas em temperatura de -18 ± 2 °C (freezer doméstico modelo biplex 380 litros, São Paulo, Brasil), ao abrigo da luz até o momento da análise. Para a flor de hibisco *in natura*, uma massa de 5,0 g da amostra foi adicionada de 40 mL de solvente. Para o hibisco desidratado utilizado 0,5 g e 50 mL de solvente. Para a semente de hibisco, foram adicionados 50 mL de solvente em 1g da amostra. Em seguida, as amostras então submetidas a dois métodos de extração. O primeiro em acetona 80% v/v e o segundo em metanol com 0,1% de HCl, sendo mantidos em dois sistemas de extração, ultrassom (modelo USC-1400, Unique, São Paulo, Brasil) e geladeira (modelo

biplex 380 litros, Consul, São Paulo, Brasil) com agitação magnética (modelo 765A, Fisatom, São Paulo, Brasil), ambos por 1 hora.

2.2. Reagentes

Todos os reagentes foram de grau analítico. Para as análises foram utilizados reagentes DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), TPTZ (2,4,6-tripiridyl-s-triazine) obtidos da Sigma Aldrich (Santa Ana, E.U.A.). Os reagentes Folin e Ciocalteu foram obtidos da Sigma Aldrich (Santa Ana, E.U.A.) e água deionizada (deionizador MilliQ, Millipore, Bedford, E.U.A.). Os reagentes ácido gálico, ácido ascórbico, carbonato de sódio, cloreto férrico e os solventes metanol, acetona e ácido clorídrico foram obtidos da Vetec (Rio de Janeiro, Brasil).

2.3. Quantificação do Conteúdo de Fenólicos Totais

O conteúdo total de compostos fenólicos foi determinado de acordo com o método de reagente Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965), onde uma alíquota de 100 μL do extrato da amostra, foi adicionada de 4 mL de água deionizada e posteriormente adicionado 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, agitado com vigor. Depois de 30 segundos e antes de 8 minutos, foi adicionado 1,5 mL de solução de carbonato de sódio 20% em balão volumétrico de 10 mL, agitando com vigor e completando-se o volume com água deionizada. Após, os balões foram colocados em ambiente escuro por 2 horas em temperatura ambiente. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância no comprimento de onda 765 nm em espectrofotômetro Hewlett-Packard modelo HP 8452A (CheadleHeath, Stockport, Cheshire, UK). Os resultados foram expressos em mg equivalentes em ácido gálico (EAG) por 100 g^{-1} flor *in natura* / flor desidratada / semente desidratada.

2.4. Determinação da Atividade Antioxidante pelo Método de Sequestro do Radical DPPH

A atividade antioxidante foi determinada através da capacidade dos antioxidantes presentes nos extratos em sequestrar o radical estável DPPH de acordo com o método descrito por Brand Williams, Cuvelier e Berset (1995), com modificações de Rufino *et al.*, 2007, onde um volume de 2,9 mL do radical DPPH (100 μmol) foi adicionado em cubetas de vidro. Em seguida, a leitura da absorbância do radical foi realizada em espectrofotômetro modelo Spectro Vision SB 1810-S no comprimento de onda 515 nm. Posteriormente, foi adicionado 100 μL do extrato à cubeta contendo o radical DPPH e este permaneceu ao abrigo da luz por 30 minutos. Em seguida foi realizada uma nova leitura da absorbância. Através da interpolação da porcentagem de inibição final do radical DPPH em curva padrão de ácido ascórbico. Os resultados foram expressos em μmol de atividade antioxidante equivalente ao ácido ascórbico (EAA) por 100 g^{-1} de flor *in natura*/ flor desidratada/ semente desidratada.

2.5. Determinação da Atividade Antioxidante *in vitro* pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)

A avaliação do potencial redutor de ferro (FRAP) foi determinada de acordo com a metodologia descrita por Benzie e Strain (1996). Um volume de 0,2 mL de solução de cloreto

férrico 3 mmol foi adicionado a um tubo de ensaio de 10 mL. Em seguida, 0,2 mL do extrato da amostra, foi adicionado ao tubo de ensaio, homogeneizado em vórtex (modelo QL-901, Biomixer, São Paulo, Brasil), acondicionado em banho Maria (modelo 550, Fisatom, São Paulo, Brasil) a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 30 minutos, seguido de adição de 3,6 mL de solução de TPTZ, agitação e tempo de reação de em temperatura ambiente por 10 minutos e leitura da absorbância em espectrofotômetro modelo Spectro Vision SB 1810-S no comprimento de onda 620 nm. Os valores de potencial de redução foram calculados através da interpolação da absorbância final em curva padrão de ácido ascórbico e expressos em μmol de atividade antioxidante equivalentes ao ácido ascórbico (EAA) por 100 g de flor *in natura*/ flor desidratada/ semente desidratada.

2.6 Análise Estatística

As análises foram realizadas em triplicata e para identificar diferenças significativas entre as médias, foram utilizadas as análises de variância (ANOVA) e o teste de Tukey pelo *software* gratuito Assistat 7.7 beta. Diferenças entre as médias no nível de 5% ($p < 0,05$) foram consideradas significativas.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Conteúdo de Fenólicos Totais

De acordo com a Tabela 1, observa-se que para a flor *in natura* e para a semente desidratada, não houve diferença significativa entre os mecanismos de extração, independente do solvente utilizado. Já para a flor desidratada, foram encontradas maiores concentrações de fenólicos totais em relação as demais amostras, onde independente do mecanismo de extração, a acetona 80% se mostrou o solvente mais eficiente para extração (1835,55 e 1770,16 EAG 100 g^{-1} em geladeira e ultrassom, respectivamente).

A partir dos dados obtidos, observa-se que para a extração dos compostos fenólicos em flor desidratada, o solvente acetona 80% apresentou maior eficiência, decorrente provavelmente da maior afinidade dos compostos da amostra com o solvente. Já para a flor *in natura* e semente desidratada não foi possível indicar o melhor solvente nem o melhor mecanismo de extração. Entretanto, estes dados permitem indicar o solvente acetona 80% como o mais eficiente para a extração de compostos fenólicos nessas três matrizes distintas, independente do mecanismo de extração.

Tabela 1 – Conteúdo de fenólicos totais e atividade antioxidante *in vitro* em flor de hibisco *in natura*/ flor desidratada/ semente desidratada com diferentes solventes e métodos de extração

Planta	Sistema de Extração	Solvente	Fenólicos totais*	FRAP**	DPPH**
FI	Geladeira	Acetona	140,94±5,75 ^c	610,84±14,99 ^{ef}	1297,57±48,36 ^d
	Ultrassom	Acetona	141,11±5,66 ^c	669,68±18,13 ^{ef}	1198,81±51,74 ^d
	Geladeira	Metanol	135,80±2,32 ^c	383,48±18,48 ^f	967,24±12,77 ^d
	Ultrassom	Metanol	132,93±3,17 ^c	605,23±22,52 ^{ef}	866,03±59,21 ^d
FD	Geladeira	Acetona	1835,55±98,08^a	6119,85±346,74^a	8942,46±390,87^a
	Ultrassom	Acetona	1770,16±87,66^{ab}	6011,71±95,64^a	8438,69±541,05^a
	Geladeira	Metanol	1675,65±94,09 ^b	6216,43±105,02^a	8218,86±259,01^{ab}
	Ultrassom	Metanol	1466,58±35,56 ^c	5473,03±97,85 ^b	7497,05±361,05 ^b
SD	Geladeira	Acetona	435,81±27,09 ^d	1735,51±49,60 ^c	3430,75±239,73 ^c
	Ultrassom	Acetona	419,00±16,43 ^d	1638,60±86,44 ^c	2895,96±181,73 ^c
	Geladeira	Metanol	559,15±29,42 ^d	1194,94±16,74 ^d	689,93±16,07 ^d
	Ultrassom	Metanol	513,52±12,82 ^d	818,03±29,46 ^e	783,91±2,36 ^d

Resultados expressos em média ± DP de três repetições. ^{a-f} Letras sobrescritas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística (p<0,05) pelo Teste de Tukey. *Valores expressos em mg EAG 100g⁻¹ de flor *in natura*/ flor desidratada/ semente desidratada. ** Valores expressos em µmol EAA 100g⁻¹ de flor *in natura*/ flor desidratada/ semente desidratada.

3.2. Atividade Antioxidante *in vitro*

Em relação a capacidade dos extratos em reduzir o ferro, medida pelo método FRAP, a flor *in natura*, não apresentou diferenças significativas entre os mecanismos de extração independente do solvente utilizado. Já a flor desidratada apresentou maiores valores de atividade antioxidante em relação as demais amostras utilizando o solvente acetona 80% em ambos os mecanismos de extração (6119,85 e 6011,71 µmol EAA 100 g⁻¹ em geladeira e ultrassom, respectivamente) e metanol 0,1% HCl com extração em geladeira (6216,43 µmol EAA 100 g⁻¹).

Para a semente desidratada, não houve diferença significativa entre os mecanismos de extração, quando utilizado o solvente acetona 80%. Entretanto, observou-se diferença significativa entre os mecanismos de extração quando utilizado o solvente metanol 0,1% HCl. Neste caso, pode-se indicar como o melhor solvente de extração a acetona 80%, pois apresentou valores estatisticamente maiores em relação ao solvente metanol 0,1% HCl.

De maneira geral, pode-se indicar, portanto, o solvente acetona 80% como o solvente mais eficiente na extração de compostos com atividade antioxidante determinada pelo método FRAP em todas as amostras analisadas, não havendo dependência do mecanismo de extração.

Já em relação a atividade antioxidante pelo método de DPPH, a flor *in natura*, novamente não apresentou diferença significativa entre os mecanismos de extração independente do solvente utilizado. Já a flor desidratada novamente apresentou maiores valores de atividade antioxidante em relação as demais amostras utilizando o solvente acetona 80% em ambos os mecanismos de extração (8942,46 µmol e 8438,69 µmol EAA 100 g⁻¹ em geladeira e ultrassom, respectivamente) e metanol 0,1% HCl com extração em geladeira (8218,86 µmol EAA 100 g⁻¹). Para a semente desidratada, houve diferença significativa entre

os solventes de extração, porém, novamente a acetona 80% pode ser indicada como o solvente mais eficiente para a extração independente do mecanismo de extração utilizado.

Assim, pode-se indicar o solvente acetona 80% como o solvente mais eficiente na extração de compostos com atividade antioxidante determinada pelo método DPPH em todas as amostras analisadas, independente do mecanismo de extração utilizado.

Para todas as amostras analisadas, os dados mostram que não foi possível identificar o melhor mecanismo de extração de compostos com atividade antioxidante determinada pelo método FRAP e DPPH, ambos os mecanismos, ultrassom e geladeira com agitação magnética foram eficientes.

4. CONCLUSÃO

Na avaliação final das amostras, podemos concluir que o solvente mais indicado para determinação de fenólicos totais e atividade antioxidante pelo método FRAP e DPPH é a acetona 80%. Já em relação ao mecanismo de extração, observou-se que este não apresentou influência significativa sobre a extração de compostos com atividade antioxidante, podendo ser adotado qualquer um dos mecanismos propostos neste trabalho.

Por fim, notou-se ainda que a flor desidratada apresentou os maiores valores de fenólicos totais e atividade antioxidante em ambos os mecanismos e solventes utilizados em relação as demais amostras. Estes resultados mostram que o processo de desidratação possui uma grande influência no conteúdo de compostos bioativos e atividade antioxidante do hibisco, fortalecendo a proposta de que o uso de produtos desidratados pode ser benéfico a saúde.

5. REFERÊNCIAS

AHMED, Z. S.; ABOZED, S. S. Functional and antioxidant properties of novel snack crackers incorporated with *Hibiscus sabdariffa* by-product. *J. Adv. Res.*, 2014.

AJAY, M.; CHAI, H. J.; MUSTAFA, A. M.; GILIANI, A. H.; MUSTAFA, M. R. Mechanisms of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. *J. Ethnopharmacol.*, v.109, p. 388-393, 2007.

ALARCON-AGUILAR, F. J. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in MSG mice. *J. Ethnopharmacol.*, v. 114, p. 66-71, 2007.

ALI, B. H.; WABEL, N. A.; BLUNDEN, G. Phytochemical, Pharmacological and Toxicological Aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: A Review. *Phytoter. Res.*, v. 19, p. 369-375, 2005.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP assay. *Anal. Biochem.*, v. 239, p. 70-76, 1996.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. *Lebensm Wiss. Technol.*, v. 28, p. 25-30, 1995.

- DA-COSTA-ROCHA, I.; BONNLAENDER, B.; SIEVERS, H.; PISCHEL, I.; HEINRICH, M. *Hibiscus sabdariffa* L. – A phytochemical and pharmacological review. *Food Chem.*, v. 165, p. 424-443, 2014.
- GUARDIOLA, S.; MACH, N. Potencial terapéutico del *Hibiscus sabdariffa*: una revisión de las evidencias científicas. *Endocrinol. Nutr.*, v. 61, p. 274-295, 2014.
- IYARE, E. E.; ADEGOKE, O. A.; NWAGHA, U. I. Mechanism of the decreased food consumption and weight gain in rats following consumption of aqueous extract of the calyx of *Hibiscus sabdariffa* during pregnancy. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, v.1, p. 185-188, 2010.
- LIN, H-H.; CHAN, K.-C.; SHEU, J.-Y.; HSUAN, S.-W.; WANG, C.-J.; CHEN, J.-H. *Hibiscus sabdariffa* leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Food Chem.*, v. 132, p. 880-891, 2012.
- OKOKO, T.; ERE, D. *Hibiscus sabdariffa* extractivities on cadmium-mediated alterations of human U937 cell viability and activation. *Asian Pac. J. Trop. Med.*, v. 1, p. 33-36, 2012.
- PATEL, S. *Hibiscus sabdariffa*: An ideal yet under-exploited candidate for nutraceutical applications. *Biomed. Prev. Nutr.*, v. 4, p. 23-27, 2014.
- RAMÍREZ-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 Chem.*, v. 134, p. 1425-1431, 2012.
- RUFINO, M. S.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comunicado técnico online 127. 2007. Disponível em: http://www.cnpat.embrapa.br/cnpat/down/index.php?pub/Cot_127.pdf. Acesso em: 25 dez. 2014.
- SINDI, H. A.; MARSHALL, L. J.; MORGAN, M. R. A. Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. *Food Chem.*, v. 164, p. 23-29, 2014.
- SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *Am. J. Enol. Viticult.*, v. 16, p. 144-158, 1965.