

INSTITUTO FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CÂMPUS SÃO MIGUEL DO OESTE  
TECNOLOGIA EM ALIMENTOS

JANIELE DOS SANTOS  
TÂNIA SOMERA

**EFEITO DAS CONDIÇÕES DE INFUSÃO SOBRE O TEOR DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS DO CHÁ DE HIBISCO (*Hibiscus sabdariffa* L.)**

São Miguel do Oeste – SC

2022

JANIELE DOS SANTOS

TÂNIA SOMERA

**EFEITO DAS CONDIÇÕES DE INFUSÃO SOBRE O TEOR DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS DO CHÁ DE HIBISCO (*Hibiscus sabdariffa* L.)**

Trabalho de Conclusão de Curso  
apresentado ao Curso de Tecnologia  
em Alimentos do Câmpus São Miguel  
do Oeste do Instituto Federal de Santa  
Catarina como requisito à obtenção do  
diploma de Tecnólogo em Alimentos.

Orientador: Prof<sup>a</sup> Dra Tahis Regina  
Baú

Coorientador: Prof<sup>a</sup> Dra Stefany  
Grützmänn Arcari

São Miguel do Oeste – SC

2022

**EFEITO DAS CONDIÇÕES DE INFUSÃO SOBRE O TEOR DE COMPOSTOS  
BIOATIVOS DO CHÁ DE HIBISCO (*Hibiscus sabdariffa* L.)**

TÂNIA SOMERA  
JANIELE DOS SANTOS

Este trabalho foi julgado adequado como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos, pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Santa Catarina, e aprovado na sua forma final pela comissão avaliadora abaixo indicada.

São Miguel do Oeste, 10 de junho de 2022.

---

Tahis Regina Baú, Dra.

Orientadora

Instituto Federal de Santa Catarina

---

Stefany Grützmänn Arcari, Dra.

Coorientadora

Instituto Federal de Santa Catarina

---

Keli Cristina Fabiane, Dra.

Instituto Federal de Santa Catarina

---

Fernanda Stoffel, Dra.

Instituto Federal de Santa Catarina

As assinaturas da banca estão devidamente registradas na ata de defesa, arquivada junto à Coordenação do Curso.

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiro agradecer a Deus, por ter permitido que tivéssemos saúde e determinação para não desanimar durante a nossa caminhada.

Também gostaríamos de agradecer a todos os professores que nos auxiliaram nessa jornada, em especial a nossa orientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Tahis Regina Baú e ao nossa coorientadora Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Stefany Grützmänn Arcari pela paciência, dedicação, por toda a ajuda prestada e por nos auxiliarem da melhor forma possível.

Gostaríamos de agradecer aos nossos membros da banca avaliadora.

Além disso, gostaríamos de agradecer a toda nossa família e amigos que nos deram apoio e suporte, para não desistirmos.

Ao Instituto Federal de Santa Catarina – Câmpus São Miguel do Oeste, essencial para o nosso processo de formação profissional, pela dedicação, e por tudo o que aprendemos ao longo dos anos do curso.

Enfim, agradecemos a todos que nos auxiliaram de uma forma especial.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Planta de Hibisco	8
Figura 2 - Flor e fruto da planta do hibisco	8
Figura 3 - Estrutura básica de um fenol	10
Figura 4 - Estrutura química dos flavonoides	12
Figura 5 - Estrutura genérica dos principais flavonoides	12
Figura 6 - Estrutura dos ácidos benzóicos (a) e ácido cinâmico (b)	13
Figura 7 - Estruturas químicas das antocianinas	14
Figura 8 - Antocianidinas naturais mais importantes	15
Figura 9 - Superfície de resposta gerada para o teor de compostos fenólicos totais, em função da temperatura de infusão ( $x_1$ ) e tempo de infusão ( $x_2$ ) do cálice de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	29
Figura 10 - Superfície de resposta gerada para o teor de antocianinas, em função da temperatura de infusão ( $x_1$ ) e tempo de infusão ( $x_2$ ) do cálice de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	31

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Classe de compostos fenólicos em plantas	11
Tabela 2 - Condições para a infusão do cálice de <i>Hibiscus spp.</i>	17
Tabela 3 - Planejamento fatorial $3^2$ aplicado às condições de extração de compostos bioativos do cálice de hibisco	21
Tabela 4 - Comparação da composição centesimal	23
Tabela 5 - Planejamento fatorial aplicado na infusão do cálice de hibisco em relação a função-resposta de compostos fenólicos e antocianinas	24
Tabela 6 - Análise de Variância (ANOVA) do modelo obtido pela aplicação da metodologia de superfície de resposta aos dados experimentais	28

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>6</b>
<b>2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>7</b>
<b>2.1 Características gerais do hibisco .....</b>	<b>7</b>
<b>2.2 Composição química .....</b>	<b>9</b>
<b>2.3 Compostos fenólicos .....</b>	<b>10</b>
2.3.1 Antocianinas .....	14
<b>2.4 Propriedades terapêuticas do hibisco .....</b>	<b>16</b>
<b>2.5 Processo de obtenção do chá do hibisco.....</b>	<b>17</b>
2.5.1 Efeito das condições de infusão na extração de compostos bioativos.....	18
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>19</b>
3.1 Objetivo geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>20</b>
4.1 Obtenção e caracterização do cálice de hibisco .....	20
4.2 Preparo da infusão .....	20
4.3 Estimativa do Conteúdo Fenólico Total .....	21
4.4 Determinação de Antocianinas Monoméricas .....	22
4.5 Análise estatística.....	22
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>23</b>
5.1 Composição química do cálice de hibisco.....	23
5.2 Teor de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas em chá de hibisco..	24
5.3 Efeito da temperatura e tempo no teor de conteúdo fenólicos totais e antocianinas monoméricas no chá de hibisco .....	27
<b>6 CONCLUSÃO.....</b>	<b>32</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>33</b>

## RESUMO

O chá de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) tem sido considerado uma importante fonte de compostos bioativos, destacando-se os compostos fenólicos e antocianinas, que estão relacionados ao potencial antioxidante e a diversas propriedades terapêuticas atribuídas a esta bebida. A infusão do cálice de hibisco é o método mais usado para a elaboração do chá e, dependendo do tempo e da temperatura utilizada, o teor de compostos bioativos extraídos pode ser alterado. O objetivo deste trabalho foi analisar o efeito das condições de infusão sobre os compostos bioativos de chá de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.). A infusão foi realizada utilizando 1,5 g de cálices triturados e secos e 75 mL de água destilada. Para avaliar o efeito da temperatura ( $X_1$ ) e tempo ( $X_2$ ) na extração de compostos bioativos foi aplicado um planejamento fatorial  $3^2$  com duas repetições no ponto central, totalizando 10 ensaios. Cada ensaio foi realizado em frasco de vidro incubado em banho-maria em diferentes temperaturas ( $X_1= 60, 75$  e  $90^\circ\text{C}$ ) e tempos ( $X_2= 5, 20$  e  $35$  min). O conteúdo de fenólicos totais foi determinado utilizando o método de Folin-Ciocalteu e o teor de antocianinas realizada de acordo com o método do pH diferencial, utilizando método espectrofotométrico. As diferentes condições aplicadas no preparo do chá de hibisco afetaram as funções-respostas investigadas. O teor de compostos fenólicos variou 10,13 a 31,28 mg EAG/100 mL e o teor de antocianinas variou de variou de 0 a 85,9 mg delphinidina 3-sambubiosídeo/L. A partir da aplicação da técnica de desejabilidade, definiu-se que quando o chá de hibisco é preparado com infusão a  $90^\circ\text{C}$  por 35 min, apresenta maior teor de compostos fenólicos e antocianinas.

Palavras-chave: *Hibiscus sabdariffa* L. Compostos fenólicos. Antocianinas. Infusão. Temperatura. Tempo.



## 1 INTRODUÇÃO

O *Hibiscus sabdariffa* L. conhecido como hibisco, vinagreira, rosela, caruru-azedo, azedinha, caruru-da-guiné, azeda-da-guiné, quiabo-azedo, quiabo-róseo, quiabo-roxo, rosela, rosélia, groselha, quiabo-de-angola, groselheira (LORENZI; MATOS, 2002) é uma espécie vegetal da família Malvaceae, natural da África Oriental (PANIZZA, 1997). É um arbusto que pode atingir cerca de 2 a 3 metros de altura, de cor avermelhada e folhas verde-escuras. Suas flores são solitárias, branco amareladas e com um cálice avermelhado. O fruto é uma cápsula, oval e cor vermelha, com três a quatro sementes pardas. A planta desenvolve-se bem em temperaturas superiores a 21 °C e 35 °C (CIPLAM, 2017). O hibisco é considerado uma importante fonte de compostos bioativos, incluindo antioxidantes, que diminuem o efeito de radicais livres no organismo humano (PINHEIRO, 2002).

Dentre os compostos bioativos presentes no hibisco, destacam-se os compostos fenólicos, que são caracterizados como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substitutos hidroxílicos e seus grupos funcionais (SOARES *et al.*, 2008). Estes compostos estão associados com a atividade fisiológica, a capacidade de capturar espécies reativas de oxigênio, quelar íons metálicos, inibir a nitroação e o potencial de auto-oxidação, diretamente relacionado com a capacidade antioxidante (ANTOLOVICH *et al.*, 2000). O hibisco também apresenta teor elevado de antocianinas, que são compostos formados por duas ou três porções, sendo uma aglicona, um grupo de ácidos orgânicos (FRANCIS, 1989), pertencentes ao grupo dos flavonoides. As antocianinas são responsáveis pela coloração vermelha dos cálices de *H. sabdariffa* L. e pela sua atividade antioxidante (RIBEIRO *et al.*, 2018).

Devido ao teor de compostos bioativos presentes, o chá de hibisco é conhecido por ter ação diurética, para o tratamento de desordem intestinal, infecção e hipertensão (MONROY-ORTIZ; CASTILLO-ESPANHA, 2007). Alguns estudos farmacológicos têm revelado um efeito terapêutico, como anticolesterol (LIN, 2007) hepatoprotetor, antibacteriano (LIU, 2006), anti-hipertensivo (HERRERA-ARELANO, 2007), antioxidante (OLATUNDE & FAKOY., 2005; RAMAKRISHNA *et al.*, 2008), anticâncer (OLIVEIRA; GARCIA, 2008).

Nesse contexto, possivelmente devido a relação inversa entre a ingestão de chá e risco de doenças degenerativa, as bebidas à base de chá *Camellia sinensis*, estão entre as mais populares do mundo e seu consumo aumentou aproximadamente 30% na última década (BHATTACHARYA; MUKHOPADHYAY; GIRI, 2011; SILVEIRA *et al.*, 2014). A infusão é o método mais utilizado para a obtenção de chás e, na preparação de chá de hibisco, podem

ser empregados os cálices, sementes e folhas secas ou frescas (COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; JABEUR *et al.*, 2017). Para que o chá tenha os benefícios esperados, é fundamental extrair o maior teor possível de compostos bioativos.

Segundo Luthria, Mukhopadhyay e Kwansa (2006), para que a extração dos compostos seja eficiente, deve-se considerar alguns fatores, como o tipo de solvente, velocidade de agitação, proporção de sólidos e solventes, tempo de extração e temperatura. Assim, muitos pesquisadores têm se dedicado a avaliar inúmeras tecnologias para aprimorar a extração, como o emprego de micro-ondas, ultrassom, campos elétricos pulsados e fluidos pressurizados e supercríticos (CORRALES *et al.*, 2017; LIAZID *et al.*, 2011; LÓPEZ *et al.*, 2018; PINELA *et al.*, 2019).

Entretanto, tais métodos são pouco aplicáveis para o consumidor, já que estas tecnologias não estão disponíveis para as pessoas que farão o preparo do chá a partir da planta de hibisco. Dessa forma, as variáveis tempo e temperatura da infusão do cálice de hibisco devem ser estabelecidas para que a extração obtenha o maior teor de compostos bioativos e, por meio destas, determinar em quais condições se obtém maior quantidade de compostos fenólicos e antocianinas.

Portanto, o objetivo deste trabalho será avaliar o efeito das condições de infusão sobre os compostos bioativos de chá de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.).

## **2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1 Características gerais do hibisco**

O hibisco, conhecido cientificamente por *H. sabdariffa* pertence à classe das Dicotyledonae, família das malváceas e gênero *Hibiscus*, que inclui mais de 300 espécies de ervas, arbustos ou árvores anuais ou perenes (COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2012). Natural do continente africano, encontra-se distribuído em regiões tropicais e subtropicais. O *H. sabdariffa* é popularmente conhecido no Brasil como hibisco, caruru-azedo, azedinha, quiabo-azedo, quiabo-róseo, quiabo-roxo, rosélia e vinagreira.

Em relação às suas características botânicas, o *H. sabdariffa* é um arbusto que pode atingir cerca de 2 a 3 metros de altura. A sua ramada é avermelhada (Figura 1), ereta e ramificada desde a base enquanto que suas folhas são verde-escuras, alternas, estipuladas, de margens serrilhadas e profundamente lobadas em três a cinco divisões. Suas flores (Figura 2) são solitárias, branco amareladas, com um cálice robusto e carnoso na base, de cor vermelha

intensa, surgindo no outono e inverno, por alguns dias. O fruto é uma cápsula (Figura 2), de formato ovalado e cor vermelha, com três a quatro sementes pardas. A planta é conveniente a clima quente, desenvolvendo-se bem em temperaturas superiores a 21 °C e 35 °C (CIPLAM, 2017).

Figura 1: Planta de Hibisco



Fonte: Camillo (2015).

Figura 2- Flor e fruto da planta do hibisco



Fonte: Rosa (2013).

Os cálices vermelhos do hibisco possuem sabor ácido e agradável, sendo utilizado para obtenção de chás, sucos, sorvetes, xaropes, geleias, pudins e outros (BORRÁS-LINARES *et al.*, 2015; COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; KOUAKOU *et al.*, 2015). Podem ser utilizados na forma *in natura* ou desidratada e apresentam várias funções fitoterápicas (CIPLAM, 2017). Assim, o cálice de hibisco vem destacando-se nas indústrias de alimentos, bebidas e farmacêuticas, que investigam a possibilidade da exploração desse vegetal como matéria-prima

para preparação de alimentos e como fonte natural de corantes (CARAMEZ, 1999; JORGE *et al.*, 1994; WASIK, 1991).

A planta de hibisco é amplamente utilizada pela população, especialmente na forma de chá e, no Brasil, seu uso é regulamentado pela RDC 267 de 2005 (BRASIL, 2005). Seus cálices são utilizados em outras bebidas, geleias e condimentos, principalmente devido aos efeitos diurético, laxante, calmante e anti escorbútico, entre outros (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Além disso, há relatos da utilização de suas sementes para a produção de óleo, sendo que as folhas e cálices também podem ser empregados para o preparo de alimentos diversos e bebidas (COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; JABEUR *et al.*, 2017).

## 2.2 Composição química

Jabeur *et al.* (2017) caracterizaram os cálices de hibisco e encontraram 7,4 g/100 g (b.s.) de cinzas, 5,5 g/100 g (b.s.) de proteínas, 0,47 g/100 g de lipídios (b.s.), 87 g/100 g (b.s.) de carboidratos. Além de ácidos orgânicos como oxálico, málico, chiquímico, fumárico, além de alfa e beta-tocoferol e quantidades importantes de cálcio e ferro (ISMAIL; IKRAM; NAZRI, 2008). Abreu *et al.*, (2019) quantificaram os cálices de hibisco e encontraram 61,76 g/100g para umidade, 22,49 g/100g (b.s.) de cinzas totais, 2,22 g/100g (b.s.) de lipídios, 0,52 g/100g (b.s.) de proteínas, 74,76 g/100g (b.s.) de carboidratos, 122,81 kcal/100g para valor energético.

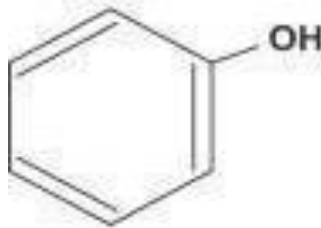
Numerosos estudos têm demonstrado o efeito de compostos fenólicos na dieta humana, devido a suas atividades antioxidantes e possíveis atividades anticarcinogênicas. O hibisco possui elevado teor e variedade de compostos fenólicos, sendo que foram identificados os seguintes: ácido clorogênico, quercetina, ácido ascórbico, luteolina, ácido cafeico, ácido protocatecúico, rutina, kaempferol e miricetina, além das antocianinas delfinidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glucosídeo, delfinidina-3-sambubiosídeo e cianidina-3-sambubiosídeo, que são responsáveis pela cor vermelha do cálice planta (AJOKU *et al.*, 2015; BORRÁS-LINARES *et al.*, 2015; JABEUR, 2017; OBOUAYEBA *et al.*, 2015). Ali, Al Wabel e Blunden (2005) também reportaram a presença de compostos fenólicos, ácidos orgânicos, esteroides, terpenoides, polissacarídeos e minerais. Também observaram que as antocianinas são o grupo de compostos fenólicos presentes em maior quantidade, sendo responsáveis por constituir os compostos bioativos do cálice. Estudos realizados por Purbowati e Maksun (2019) indicaram que o extrato de hibisco pode apresentar teores de antocianinas de 14,80 mg/g, compostos fenólicos totais de 23,77 mg/g e vitamina C 10,74 mg/g.

### 2.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são elementos que existem especialmente nas plantas, como é o caso do hibisco, mas também são capazes de serem provenientes do catabolismo dos aminoácidos. A importância oferecida a estes compostos deve-se ao fato de muitos possuírem propriedades benéficas para a saúde humana (MARQUES *et al.*, 2004). A elevada relevância em se estudar os compostos fenólicos tem relação com a atividade fisiológica, a capacidade de capturar espécies reativas de oxigênio, quelar íons metálicos, inibir a nitrosação e o potencial de auto-oxidação, diretamente relacionado com a capacidade antioxidante dos fenólicos (ANTOLOVICH *et al.*, 2000).

Os compostos fenólicos ou polifenóis fazem parte de um grupo de mais de 8.000 estruturas conhecidas (BRAVO, 1998), sendo definidos como substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais substitutos hidroxílicos, abrangendo seus grupos funcionais. Estão amplamente distribuídos no reino vegetal, desde moléculas simples até outras com alto grau de polimerização (SOARES *et al.*, 2008) (Figura 3).

Figura 3- Estrutura básica de um fenol



Fonte: Liu (2007).

Os compostos fenólicos (Tabela 1) apresentam-se em grande diversidade, amplamente distribuídos nas frutas e nos vegetais. Desse modo, são divididos em flavonoides (polifenóis) e não-flavonoides (fenóis simples ou ácidos). Os flavonoides compreendem um grupo de compostos fenólicos com muitas variações, como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas (SILVA *et al.*, 2010). Os não-flavonoides compreendem compostos como ácidos fenólicos, os estilbenos, as cumarinas e os taninos (CASSOL, 2018).

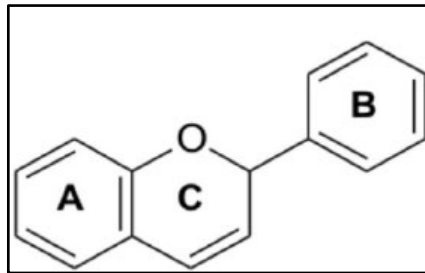
Tabela 1 - Classe de compostos fenólicos em plantas

<b>Classe</b>	<b>Estrutura</b>
Fenólicos simples, benzoquinonas	$C_6$
Ácidos hidroxibenzoicos	$C_6 - C_1$
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	$C_6 - C_2$
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanoides	$C_6 - C_3$
Nafitoquinonas	$C_6 - C_4$
Xantonas	$C_6 - C_1 - C_6$
Estilbenos, antoquinonas	$C_6 - C_2 - C_6$
Flavonoides, isoflavonoides	$C_6 - C_3 - C_6$
Ligninas, neolignanas	$(C_6 - C_3)_2$
Biflavonoides	$(C_6 - C_3 - C_6)_2$
Ligninas	$(C_6 - C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6 - C_3 - C_6)_n$

Fonte: Harborne; Baxter; Moss (1989).

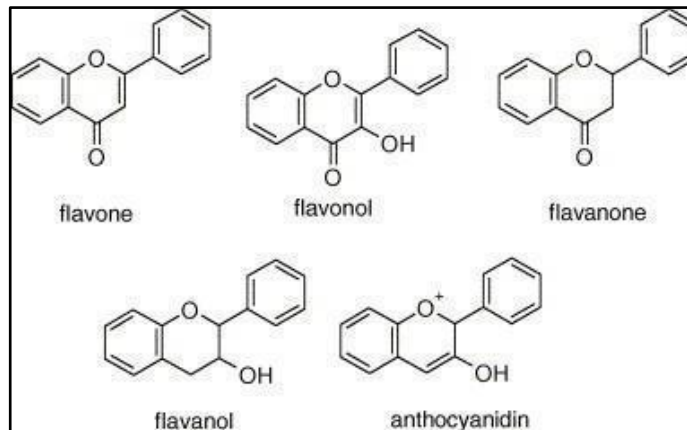
Os flavonoides possuem uma estrutura principal formada por  $C_6-C_3-C_6$ , sendo considerados os compostos mais variados do reino vegetal, que originam diversos compostos dependendo do lugar, número e combinação dos grupos que formam a molécula (SOARES, 2002). A estrutura química dos flavonoides (Figura 4) consiste em dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C. O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina (MERKEN; BEECHER, 2000). As alterações nos anéis A e B originam diferentes compostos dentro de cada classe de flavonoides, e as substituições incluem oxigenação, alquilação, glicosilação, acilação e sulfação. As alterações no anel C padrão podem originar flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, isoflavonas e antocianidinas (Figura 5) (HOLLMAN; KATAN, 1999).

Figura 4 - Estrutura química dos flavonoides



Fonte: Merken e Beecher (2000).

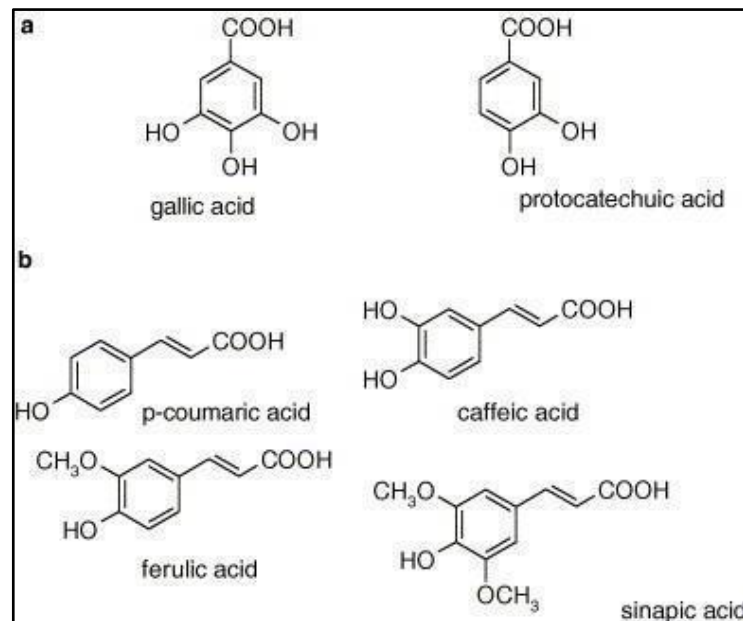
Figura 5 - Estrutura genérica dos principais flavonoides



Fonte: Balasundram; Sundram; Samman (2006).

Os ácidos fenólicos consistem em dois subgrupos, ou seja, os ácidos hidroxibenzoico e hidroxicinâmico (Figura 6). Os ácidos hidroxibenzoicos incluem os ácidos gálico, p-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siringico, que em comum têm a estrutura (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>) (BRAVO, 1998), são os ácidos fenólicos mais simples encontrados, também conhecidos como ácidos benzoicos (SOARES, 2002). Os ácidos hidroxicinâmicos são compostos aromáticos com cadeia lateral de três carbonos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), sendo os ácidos caféico, ferúlico, p-cumárico e sináptico os mais comuns (BRAVO, 1998). Os ácidos fenólicos, também podem se ligar entre si ou com outros compostos. A combinação mais importante destes ácidos ocorre com o ácido caféico, o qual, associado a um álcool-ácido cíclico, denominado ácido químico, origina o ácido clorogênico (SOARES, 2002).

Figura 6 - Estrutura dos ácidos benzóicos (a) e ácido cinâmico (b)



Fonte: Balasundram; Sundram; Samman (2006).

Nesse sentido, Piovesana e Norena (2019) realizaram um estudo para determinar o teor de compostos fenólicos no cálice de hibisco, usando a extração aquosa acidificada com (2% de ácido cítrico, p/v). Dessa forma, obtiveram um teor de composto fenólico total de 17,59 mg/g de extrato em base seca. Os principais compostos fenólicos encontrados no *H. sabdariffa* são os taninos e as antocianinas, que são detectadas em quantidades elevadas nos cálices, característico da coloração vermelha intensa do mesmo (BORRÁS-LINARES *et al.*, 2015; COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; KOUAKOU *et al.*, 2015), além da presença de flavonoides como a quercetina, luteolina, hibiscetina, sabdaretina, gossipetina. Todas estas substâncias citadas são consideradas como constituintes bioativos importantes no processo da ação antioxidante (RIBEIRO *et al.*, 2018).

Segundo Formagio *et al.*, (2015), em análise a forma de cultivo do hibisco, perceberam que as maiores concentrações de compostos fenólicos são encontradas nos cálices de hibisco, independente da forma de cultivo utilizada. Em um estudo realizado com folhas e cálices de hibisco, os cálices apresentaram teor de fenóis e flavonoides variando de 454,66 a 474,09 mg/g e 140,29 a 148,35 mg/g. Já Sabota, Pinho e Oliveira (2016) analisaram os compostos fenólicos de *H. sabdariffa* L. e obtiveram para polifenóis 37,4 mEqG/g e para flavonoides totais 12,97 mEqG/g por meio de infusão aquosa. Abreu *et al.* (2019) caracterizaram os cálices de hibisco para compostos fenólicos totais e obtiveram  $429,84 \pm 5,16$  EAG/100 g e, para atividade

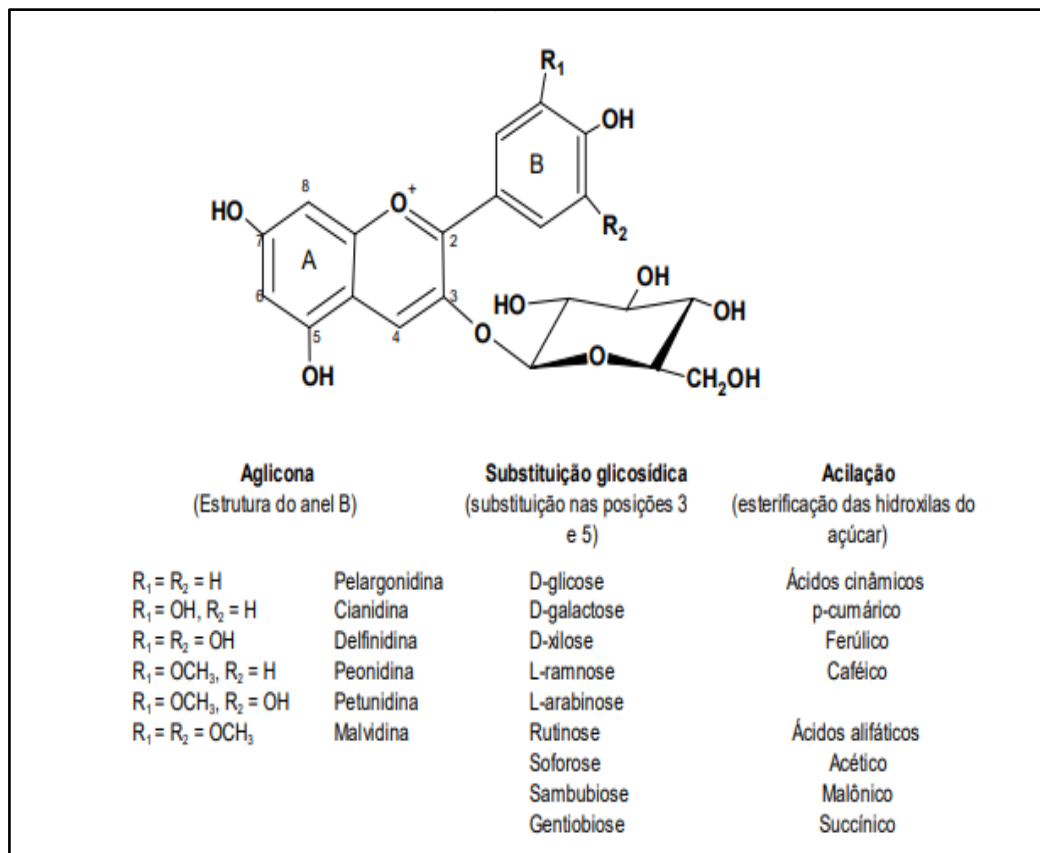


antioxidante, obtiveram  $626,32 \pm 8,03 \mu\text{mol trolox/L}$  o que confere alto potencial de compostos bioativos aos cálices de hibisco.

### 2.3.1 Antocianinas

As antocianinas compõem o grupo dos flavonoides, compostos fenólicos caracterizados pelo núcleo básico flavílio (cátion 2-fenilbenzopirílio) que consiste de dois anéis aromáticos unidos por uma unidade de três carbonos e condensada por um oxigênio. A molécula de antocianina (Figura 7) é formada por duas ou três porções, uma aglicona, um grupo de açúcares e um grupo de ácidos orgânicos (FRANCIS, 1989). Aproximadamente 22 agliconas são conhecidas, das quais 18 ocorrem naturalmente e apenas seis (pelargonidina, cianidina, delphinidina, peonidina, petunidina e malvidina) são importantes em alimentos (FRANCIS, 2000).

Figura 7 - Estruturas químicas das antocianinas

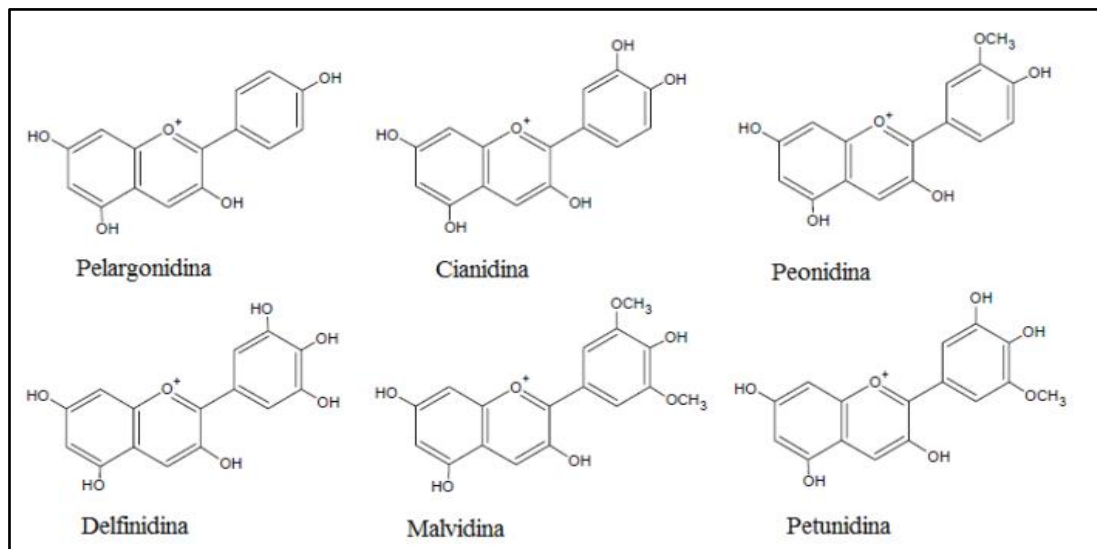


Fonte: Malacrida; Motta (2006).

As antocianinas são responsáveis pela coloração vermelha dos cálices de *H. sabdariffa* e também conferem atividade antioxidante, o que possibilita o bloqueio de radicais livres (RIBEIRO *et al.*, 2018). Esses pigmentos compõem a diferença de tonalidades de cores, variando entre vermelho, laranja e roxo, de acordo com condições intrínsecas, como o pH, encontradas nos vegetais (BROUILLARD, 1983). São compostos solúveis em água e sensíveis ao calor (SHAHIDI; NACZK, 1995) apresentando-se, na maior parte das vezes, glicosadas com açúcares que auxiliam na estabilização da molécula (FRANCIS, 1989).

As principais antocianinas são a pelargonidina, cianidina, delphinidina, petunidina, malvidina e peonidina (Figura 8). As antocianinas mais comuns em plantas são distribuídas em cianidina (50 %), pelargonidina (12 %), peonidina (12 %), delphinidina (12 %), petunidina (7 %) e a malvidina (7 %) (KONG, 2003). As antocianinas podem sofrer degradação por pH, temperatura, luz, ação de enzimas como a polifenoloxidase e peroxidase, presença de oxigênio e ácido ascórbico (SCHWARTZ *et al.*, 2010).

Figura 8 - Antocianidinas naturais mais importante



Fonte: Rein (2005).

Nunes, Thomas e Lima (2014), ao avaliar o teor de antocianinas no chá de hibisco, encontraram 193,69 mg/100 g. As principais antocianinas encontradas nos cálices de *H. sabdariffa*, são delphinidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-sambubiosídeo e cianidina-3-sambubiosídeo (ALI; AL WABEL; BLUNDEN, 2005).

Além de conferir coloração característica aos vegetais, as antocianinas estão relacionadas a hábitos saudáveis de alimentação. Ainda, a indústria alimentícia encontra nas antocianinas um potencial substituto aos corantes artificiais, atendendo um público cada vez

mais disposto a não consumir alimentos contendo corantes sintéticos (TEIXEIRA; STRINGHETA; OLIVEIRA, 2007). Estes compostos também apresentam grande importância na dieta humana, sendo capazes de prevenir doenças cardiovasculares, do câncer e de doenças neurodegenerativas e, ainda apresentam atividade antioxidante, agindo contra os radicais livres (TSENG *et al.*, 1997; FAROMBI; IGE, 2007).

#### **2.4 Propriedades terapêuticas do hibisco**

A alimentação saudável é uma das opções para reduzir o risco de desenvolvimento de enfermidades. Essa prevenção pode ser alcançada por uso de chás, como uma provável fonte de compostos capazes de reduzir o risco de aparecimento de doenças (RIBEIRO *et al.*, 2018). Neste contexto, as plantas medicinais podem ser utilizadas pela população, especialmente utilizando o processo de infusão. Dentre as espécies de interesse, destaca-se o hibisco, cujos cálices são usados na elaboração de chás e outros alimentos (OLIVEIRA *et al.*, 2013). Estudos apontam que a ingestão de chá de hibisco associado a uma dieta saudável pode auxiliar no controle da pressão sanguínea e prevenir o aparecimento de doenças, principalmente devido a atividade antioxidante dessa planta (MACIEL *et al.*, 2012).

A presença de compostos bioativos como compostos fenólicos, incluindo antocianinas e outros flavonoides, além ácidos orgânicos e polissacarídeos, confere ao hibisco propriedades antioxidantes, antibacterianas, anti-inflamatórias, hepatoprotetoras e anticolesterol (COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; FORMAGIO *et al.*, 2015; JABEUR *et al.*, 2017). Assim, o hibisco vem sendo tradicionalmente empregado na prevenção e tratamento de patologias crônicas da saúde, como hipertensão, doenças cardiovasculares, inflamações, câncer, prisão de ventre, infecções do trato urinário, diabetes e distúrbios hepáticos (BARATA *et al.*, 2016; FERNÁNDEZ-ARROYO *et al.*, 2011; JABEUR *et al.*, 2017). De acordo com Costa-Rocha (2014), às infusões de folhas ou cálices de hibisco também costumam ser empregadas na África, Índia e México em função dos seus efeitos diuréticos, aumenta a secreção da biliar, auxilia na redução da febre e hipotensores, diminuindo a viscosidade do sangue e estimulando o peristaltismo intestinal.

Ainda, o hibisco destaca-se por apresentar elevada atividade antioxidante (ALI; MOUSA; EL-MOUGY, 2003), evitando a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade e reduzindo o colesterol (CHANG-CHE *et al.*, 2004; CHANG *et al.*, 2006; LIN *et al.*, 2007), efeito anti-hipertensivo (ONYENEKWE *et al.*, 1999; MOJIMINIYI *et al.*, 2007; AJAY *et al.*, 2007), prevenção de doenças cardiovasculares (CRISTIAN *et al.*, 2006) e hepáticas (ALI; MOUSA.; EL-MOUGY, 2003), redução da obesidade (ALARCON-AGUILAR *et al.*,

2007; KIM *et al.*, 2007) e diabetes (FAROMBI; IGE, 2007), a função diurética (WRIGHT *et al.*, 2007) e a atuação *in vitro* sobre alguns tipos de câncer como leucemia (HOU *et al.*, 2005), câncer gástrico (LIN *et al.*, 2007) e *in vivo* na redução do surgimento de tumores de pele em ratos (TSENG *et al.*, 1998).

## 2.5 Processo de obtenção do chá do hibisco

O chá de hibisco geralmente é obtido utilizando o cálice desidratado, seguido de infusão em água quente. Diferentes combinações de tempo e temperatura podem ser utilizadas para obter bebidas com hibisco (Tabela 2). Nguyen e Chuyen (2020) realizaram a infusão do cálice de hibisco após secagem a 60, 80, 100 e 120 °C em estufa de secagem com ar quente, até atingir umidade inferior a 8 %. Para o preparo do chá, foi usado 1 g de cálice desidratado e 200 mL de água quente a 90 °C por 15 min e, em seguida, o chá foi resfriado até 50 °C e adicionado 0,5 g de adoçante de estévia, para a análise sensorial. Sobota, Pinho e Oliveira (2016) efetuaram a infusão aquosa de cálices de hibisco utilizando 5 g de cálices que foram colocados em um béquer, e adicionados de 200 mL de água a 80 °C deixando descansar por 15 minutos, seguido de filtração.

Tabela 2- Condições para a infusão do cálice de *Hibisco sssp.*

<b>Peso</b>	<b>Volume</b>	<b>Temperatura</b>	<b>Tempo</b>	<b>Referência</b>
1 g	200 mL	90 °C	15 min	Nguyen e Chuyen (2020)
5 g	200 mL	90 °C	15 min	Sobota, Pinho e Oliveira (2016)
2 g, 3,5 g e 5 g	100 mL	30 °C; 45 °C e 60 °C	5, 7,5 e 10 min	Fonseca (2020)
2 g	150 mL	100 °C	15 min	Ribeiro <i>et al.</i> (2018)
500 mg	100 mL	100 °C	5 min	Jabeur <i>et al.</i> (2017)

Fonte: Autoria própria (2021).

Ribeiro *et al.* (2018) produziram chá de hibisco utilizando 2 g de cálice e 150 mL de água fervente, sendo que esta mistura permaneceu em infusão por 15 minutos. Além da

elaboração de chás, o hibisco também pode ser empregado para a elaboração de outras bebidas. Fonseca (2020) elaborou cerveja artesanal adicionada de hibisco. Para obter um produto com maior teor de compostos bioativos, como compostos fenólicos e maior capacidade antioxidante, o autor realizou a infusão dos cálices em água, variando concentrações de hibisco de 2, 3,5 e 5 g, à temperatura 30, 45 e 60 °C e o tempo de extração 5, 7,5 e 10 minutos. Desse modo, o autor verificou que com 5 g/100 mL de cálice, a temperatura de 60 °C e com um tempo de extração, de no mínimo, 10 minutos se obteve os maiores teores de compostos bioativos.

Sindi, Marshall e Morgan (2014), avaliaram o efeito de diversos solventes, tempos e temperaturas para extração de compostos bioativos de flores de hibisco. Os autores concluíram que a água, com ou sem ácido fórmico, é o melhor solvente, o tempo ideal é 10 minutos e a temperatura ideal de extração é o ponto de ebulição da água. Nestas condições conseguiram atingir teores de polifenóis de  $21,67 \pm 0,93$  e  $17,94 \pm 0,29$  mg/g EAG, antocianinas e antioxidantes. Jabeur *et al.* (2017) realizaram infusão do cálice de hibisco a 100 °C por 5 minutos, utilizando 500 mg de amostra seca e 100 ml de água destilada.

### 2.5.1 Efeito das condições de infusão na extração de compostos bioativos

As infusões que são usadas para preparar bebidas aromáticas e com finalidades terapêuticas, são realizadas despejando água quente ou fervente sobre as partes secas das plantas. Esse tipo de processo é utilizado para fazer bebidas que são amplamente consumidas no mundo, conhecidas como fontes importantes de compostos fenólicos da dieta e considerados antioxidantes naturais abundantes (FIGUEROA PÉREZ *et al.*, 2014).

Desse modo, para a extração dos compostos fenólicos, além do solvente, fatores como a temperatura também são importantes. As elevadas temperaturas favorecem a extração dos compostos, pois facilitam a permeabilidade das paredes celulares, aumentam a solubilidade e a difusão dos componentes que serão extraídos. Entretanto, temperaturas muito elevadas podem causar a degradação dos compostos fenólicos, uma vez que a exposição dos compostos fenólicos a altas temperaturas e prolongados tempos de extração podem ocasionar a oxidação dos compostos. Curtos períodos de extração podem ser ineficientes e não extrair quantidades adequadas de compostos fenólicos (XU; CHANG, 2007). Além disso, o tamanho das partículas da amostra também afeta a extração, e esta pode ser mais eficiente se o tamanho da partícula da matriz sólida for menor, já que aumenta a área disponível para a transferência de massa (PEREIRA; MEIRELES, 2010).

Por isso, para Naczk e Shahidi (2004), é importante que as extrações desses compostos tenham a mínima degradação possível. As antocianinas, principais compostos bioativos presentes no hibisco, são solúveis em solventes polares e com ácido clorídrico ou ácidos orgânicos. Além disso, são instáveis em soluções com pH neutro ou alcalino, contudo, mesmo em soluções ácidas a cor pode desaparecer se exposta a luz, sendo que o aquecimento é um fator que acelera a degradação das antocianinas (MARÇO; POPPI; SCARMINIO, 2008).

Para Pedro, Granato e Rosso (2016), o tempo e a temperatura são condições que agem sobre a extração das antocianinas. Fonseca (2020), avaliou o máximo teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante em extrato aquoso de cálice de hibisco por meio da infusão, para ser adicionado em uma cerveja artesanal, e percebeu que quanto maior a concentração de cálice de hibisco na infusão, e quanto maior o tempo e a temperatura, maiores são os valores de atividade antioxidante e compostos fenólicos. No entanto, deve-se avaliar os tempos de extração desses compostos. Para Naczk e Shahidi (2004), extensos períodos de extração e temperatura muito elevadas, aumentam a probabilidade de oxidação dos compostos fenólicos e degradação de antocianinas.

Ribeiro *et al.* (2018) avaliaram a estabilidade da atividade antioxidante e de outros compostos químicos após a elaboração do chá de hibisco. Os resultados obtidos da análise por cromatografia e da atividade antioxidante indicaram instabilidade na atividade antioxidante e no teor de compostos bioativos após 12 horas de preparo. De acordo com o estudo, se indica o consumo do chá até 1 hora depois do preparo.

Uma vez que os cálices de hibisco apresentam vários compostos bioativos solúveis em água, incluindo antocianinas (COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; PIOVESANA; NARENA, 2019) a investigação da condição ideal de extração destes compostos torna-se relevante para maximizar o potencial de promoção à saúde relacionado ao hibisco.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

Avaliar o efeito das condições de infusão sobre os compostos bioativos de chá de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.).

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Definir a composição química do cálice de hibisco;
- Realizar a infusão de cálice de hibisco em diferentes condições de tempo e temperatura, utilizando o planejamento fatorial;
- Estimar o conteúdo fenólico total;
- Determinar o teor de antocianinas monoméricas;
- Aplicar o planejamento fatorial para avaliar o efeito de diferentes tempos e temperaturas na extração de conteúdo fenólicos e antocianinas no chá de hibisco.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Obtenção e caracterização do cálice de hibisco**

Os experimentos foram realizados nos laboratórios de Bromatologia e de Análise Instrumental do Instituto Federal de Santa Catarina, Campus de São Miguel do Oeste - SC.

O cálice de *H. sabdariffa* foi fornecido por uma propriedade rural agroecológica localizada no oeste catarinense, na cidade de Descanso (-26,8137940; -53,5747960) da safra 2020/2021, e submetido a sanitização utilizando 15 ppm de cloro por 15 minutos. Foi realizado a secagem dos cálices a temperatura ambiente ( $24 \pm 5$  °C) por 4 dias em ambiente ventilado, e estocagem sob congelamento (-18 °C) até o momento de realização das análises.

Os teores de umidade, cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos dos cálices de hibisco foram determinados em triplicata (AOAC, 2006). O teor de umidade foi determinado utilizando o método gravimétrico de secagem em estufa a 105°C. O teor de cinzas foi determinado pela incineração da amostra em mufla a 550°C. O teor de proteínas foi determinado pelo método de Micro-Kjehdahl, o procedimento foi composto por três etapas: digestão, destilação e titulação. Foi usado o fator de 6,25 para converter o teor de nitrogênio total em proteínas. O teor de lipídios foi determinado pelo método de Soxhlet, com tempo de extração em torno de 6 a 8 horas, utilizando éter de petróleo. O teor de carboidratos foi determinado por diferença dos demais constituintes da composição química (umidade, cinzas, lipídeos e proteínas).

### **4.2 Preparo da infusão**

Para obtenção dos chás, o hibisco foi triturado (Processador Oster, FPSTHB2615R, Brasil) por 30 s, sendo utilizado 1,5 g de cálice de hibisco e 75 mL de água destilada para o preparo da infusão. Para avaliar o efeito da temperatura ( $X_1$ ) e tempo ( $X_2$ ) na extração de

compostos bioativos foi aplicado um planejamento fatorial  $3^2$  (Tabela 3), com duas repetições no ponto central, totalizando 10 ensaios. Cada ensaio foi realizado em frasco de vidro em banho-maria por diferentes temperaturas ( $X_1= 60, 75$  e  $90$  °C) e tempos ( $X_2= 5, 20$  e  $35$  min). Os chás de hibisco foram imediatamente resfriados até atingir temperatura ambiente ( $24 \pm 5$  °C), filtrados em uma malha de 150 mesh e protegidos da luz. As funções-respostas investigadas na infusão foram o teor de conteúdo fenólicos ( $Y_1$ ), teor de antocianinas totais ( $Y_2$ ).

Tabela 3 - Planejamento fatorial  $3^2$  aplicado às condições de extração de compostos bioativos do cálice de hibisco

Ensaio	Níveis reais e codificados das variáveis independentes*	
	$x_1$ ( $X_1$ )	$x_2$ ( $X_2$ )
01	-1 (60)	-1 (5)
02	-1 (60)	0 (20)
03	-1 (60)	1 (35)
04	0 (75)	-1 (5)
05	0 (75)	0 (20)
06	0 (75)	1 (35)
07	1 (90)	-1 (5)
08	1 (90)	0 (20)
09	1 (90)	1 (35)
10	0 (75)	0 (20)

\* $x_1$  e  $x_2$  são os níveis codificados das variáveis independentes  $X_1$  (temperatura em °C) e  $X_2$  (tempo em min.).

Fonte: A autoria própria (2021).

### 4.3 Estimativa do Conteúdo Fenólico Total

O teor de compostos fenólicos totais foi estimado utilizando o método colorimétrico de Folin Ciocalteu (SINGLETON *et al.*, 1999). Para a estimativa, as amostras foram diluídas (1:5, 1:10 e 1:20 v/v) com o próprio solvente de extração (água destilada). Foi pipetado 1 mL do chá do hibisco, seguido da adição de 1 mL de Folin-Ciocalteu (Sigma-Aldrich 2 N) que foi diluído para concentração de 0,9 N. Após a homogeneização em vórtex, foi adicionado 1 mL de carbonato de sódio 10% (m/v), seguido de homogeneização. Todos os tubos foram mantidos ao abrigo da luz por 1 hora e, posteriormente, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Biospectro, SP22 Curitiba - PR, Brasil) a 760 nm. A curva analítica foi construída com o uso de uma solução 0,4 mg de ácido gálico/mL com concentração mínima de 0,004 mg/mL e



máxima de 0,024 mg/mL. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico (EAG)/100 mL.

#### 4.4 Determinação de Antocianinas Monoméricas

A determinação das antocianinas foi realizada de acordo com o método do pH diferencial do AOAC (2005). Foi utilizado a solução tampão de cloreto de potássio 0,025 M pH 1,0 e a solução tampão acetato de sódio 0,4 M pH 4,5. As amostras de chá de hibisco foram diluídas em balões volumétricos de 50 mL, utilizando pipetas volumétricas para o procedimento. A determinação do fator de diluição foi obtida por meio da diluição da porção da amostra do chá com o tampão de pH 1,0 até a absorbância a 517 nm esteja dentro da faixa linear do espectrofotômetro. Para a determinação das antocianinas, foi determinada a absorbância, em espectrofotômetro (Biospectro, SP22 Curitiba - PR, Brasil), da amostra de chá diluída com o tampão de pH 1,0 e tampão de pH 4,5 a 517 e 700 nm, no intervalo de 20 a 50 minutos após a mistura. A água destilada foi utilizada como branco.

A concentração de pigmento de antocianinas foi expressa como equivalente de delphinidina 3-sambubiosídeo como segue (Equação 1):

$$(Eq.1). \text{ Antocianinas (mg/L) } = \frac{A.MW.DF.10^3}{(\varepsilon. l)}$$

Em que:

MW: massa molecular para delphinidina 3-sambubiosídeo (597,14 g/mol); DF: fator de diluição da amostra;  $\varepsilon$  absorvidade molar da delphinidina 3-sambubiosídeo (26000 L/mol.cm)  $10^3$ : fator de conversão de grama para miligrama; A: representado na equação abaixo (Equação 2):

$$(Eq. 2). A = (\text{Abs } 520 - \text{Abs } 700) \text{ pH } 1,0 - (\text{Abs } 520 - \text{Abs } 700) \text{ pH } 4,5$$

#### 4.5 Análise estatística

O efeito das variáveis independentes temperatura ( $x_1$ ) e do tempo ( $x_2$ ) sobre o teor de conteúdo fenólicos ( $y_1$ ) e teor de antocianinas monoméricas ( $y_2$ ), foram investigadas por um planejamento fatorial completo, por meio do seguinte modelo (Equação 3):

$$(Eq. 3). Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_2x_2 + \beta_{11}x_{12} + \beta_{22}x_{22} + \beta_{12}x_1x_2 + e$$

Em que:  $Y$  = função-resposta,  $x_1$  e  $x_2$  = níveis codificados das variáveis independentes,  $\beta$  = coeficientes de regressão,  $e$  = erro experimental.

Os gráficos de superfície de resposta, modelos matemáticos e parâmetros de desejabilidade foram gerados para avaliar a condição de infusão com a máxima extração dos compostos de interesse, por meio análise de variância (ANOVA), utilizando o software Statistica 10.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Composição química do cálice de hibisco

Os cálices de hibisco desidratados apresentaram em média  $21,74 \pm 0,80$  % de umidade,  $6,47 \pm 0,16$  % de cinzas,  $2,48 \pm 0,06$  % de proteínas,  $2,57 \pm 0,28$  % de lipídeos e  $66,75 \pm 0,92$  % de carboidratos. Em comparação com resultados de Abreu *et al.* (2019) e Azza, Ferial e Esmart (2011), que também determinaram a composição química do hibisco, sendo que o primeiro que utilizou o cálice *in natura* e o segundo cálice seco, percebeu-se bastante variação nos resultados obtidos. Como são amostras de lugares diferentes, essas variações podem ser provocadas por fatores como lugar de cultivo, tipo do solo, adubação, clima, índice pluviométrico. Além disso, percebeu-se que as diferenças mais significativas estão relacionadas ao estado de secagem do cálice, uma vez que os resultados que mais se assemelham com as obtidas neste estudo foram os resultados obtidos por Azza, Ferial e Esmart (2011) que utilizou o cálice seco.

Tabela 4 - Comparação da composição centesimal

<b>Autores</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Cinzas (%)</b>	<b>Proteínas (%)</b>	<b>Lipídios (%)</b>	<b>Carboidratos (%)</b>
<b>Azza, Ferial e Esmart (2011)</b>	12,81	11,24	7,51	0,46	69,62
<b>Abreu <i>et al.</i> (2019)</b> *in natura	61,76	8,6	0,2	0,85	28,59

Fonte: Azza, Ferial e Esmart (2011); Abreu *et al.*, (2019).

## 5.2 Teor de compostos fenólicos totais e antocianinas monoméricas em chá de hibisco

Os efeitos das condições de infusão do cálice de hibisco, temperatura ( $x_1$ ) e tempo ( $x_2$ ) sobre o teor de conteúdo fenólicos e antocianinas foram investigados e os dados são apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Planejamento fatorial aplicado na infusão do cálice de hibisco em relação a função-resposta de compostos fenólicos e antocianinas

Ensaio	Níveis reais e codificados das variáveis independentes*		Funções-resposta**			
	$x_1$ ( $X_1$ )	$x_2$ ( $X_2$ )	Compostos Fenólicos		Antocianinas	
			Y 1 experimental	$\hat{Y}_1$ estimado	Y 2 experimental	$\hat{Y}_2$ estimado
01	-1 (60)	-1 (5)	10,13	10,7	0,00	-9,3
02	-1 (60)	0 (20)	16,92	15	20,19	20,3
03	-1 (60)	1 (35)	17,87	19,3	18,83	24,1
04	0 (75)	-1 (5)	17,68	17,6	47,85	35,1
05	0 (75)	0 (20)	21,18	21,9	28,79	45,8
06	0 (75)	1 (35)	31,28	26,2	85,90	55,7
07	1 (90)	-1 (5)	26,31	24,5	69,90	50,3
08	1 (90)	0 (20)	29,10	28,8	75,03	80,1
09	1 (90)	1 (35)	30,78	33,1	72,96	83,8
10	0 (75)	0 (20)	17,67	21,9	21,13	45,8

\*  $x_1$  e  $x_2$  são níveis codificados;  $X_1$ = temperatura e  $X_2$ = tempo de infusão

\*\* $Y_1$ : Teor de compostos fenólicos (mg EAG/100 mL);  $Y_2$ : Teor de antocianinas monoméricas (mg Delphinidina-3-sambubiosídeo/L).

Fonte: Autoria própria (2022).

O conteúdo de compostos fenólicos, no chá de hibisco, variou de 10,13 mg EAG/100 mL a 31,28 mg EAG/100 mL (Tabela 4). Piovesana e Norena (2019) obtiveram teores maiores (17,59 mg/g de extrato em base seca) a partir dos cálices de hibisco, utilizando água acidificada (2% de ácido cítrico, p/v) que foi adicionada aos cálices na proporção de 1:5 (p/p), e a mistura foi triturada no liquidificador. Estes autores aplicaram um planejamento fatorial  $2^4$ , na qual avaliaram a influência do tempo (3 e 5 min), temperatura (35 °C e 55 °C), e uma complexo enzimático de celulose, hemicelulase e pectinase (0 e 50  $\mu$ L / 1000 g) e velocidade de agitação (200 e 400 rpm). Por meio de cromatografia líquida, foram quantificados e identificados 14

compostos fenólicos presentes no cálice de hibisco, dentre eles os ácidos fenólicos totais (4,165 a 6,929 mg/g de extrato em base seca), sendo que os principais ácidos encontrados foram o ácido 3-cafeoilquínico (2,089 a 3,568 mg/g b.s), ácido 5-cafeoilquínico (1,726 a 2,751 mg/g b.s) e o 3- *p*-Ácido cumaroilquínico (0,163 a 0,310 mg/g b.s).

Quanto aos flavonoides totais quantificados por Piovesana e Norena (2019), obtiveram teores de 0,349 a 0,598 mg/g de extrato em b.s, destacaram-se miricetina 3-sambubiósido (0,0506 a 0,08712 mg/g b.s) quercetina 3-sambubiósido (0,152 a 0,262 mg/g b.s), quercetina 3-rutinosídeo (0,110 a 0,183 mg/g b.s), quercetina 3-glicosídeo (0,013 a 0,017 mg/g b.s), Kaempferol 3-O-rutinosídeo (0,021 a 0,030 mg/g b.s) e as antocianinas (5,456 a 10,084 mg/g b.s). Para Piovesana (2016), os ácidos fenólicos, o ácido 3-cafeoilquínico e ácido 5-cafeoilquínico, com  $79,22 \pm 7,01$  e  $68,35 \pm 0,19$  mg/100g de massa fresca, representam 15 e 13 %, respectivamente, do total de compostos fenólicos presente no cálice de hibisco.

Em relação aos resultados obtidos por Piovesana e Norena (2019), percebe-se que o menor valor de extração foi obtido nas menores condições e o maior valor de extração nas maiores condições de tempo (3 h), temperatura (35 °C), velocidade de agitação (200 rpm) e quantidade de enzima (0 g), sendo evidente a influência das variáveis investigadas na obtenção dos resultados. Os autores utilizaram condições mais brandas de temperatura na extração, mas aliado às outras condições investigadas obtiveram resultados significativos, que mostram que as variáveis avaliadas juntamente com o uso de água acidificada influenciaram na extração de compostos fenólicos e apresentam-se bastante promissores para serem utilizados.

Em um estudo realizado por Barbosa *et al.* (2020) para a quantificação de compostos fenólicos no extrato aquoso de cálice de *H. sabdariffa*, foram utilizadas 3 marcas de cálice seco de hibisco, submetidas a infusão utilizando 1,25 g de cálices secos e 250 mL de água filtrada a temperatura aproximada de 90 °C, que foram adicionados em béqueres de vidro. Os recipientes permaneceram em infusão por 15 min e em seguida foram armazenados em garrafas plásticas à temperatura ambiente (27 °C  $\pm$  2). Os autores obtiveram um teor de compostos fenólicos que variou 12,24 mg EAG/100 mL a 14,16 mg EAG/100 mL. Variações nos resultados obtidos nos estudos podem estar relacionadas com a quantidade de amostra, tempo de extração, temperatura do solvente, e métodos analíticos utilizados. Nesse sentido, experimentalmente na temperatura de 90 °C por 20 minutos foi obtido um teor de 29,10 mg EAG/100 mL, um teor mais elevado do que o obtido por Barbosa *et al.* (2020) mesmo que utilizaram a mesma temperatura e apenas 5 minutos de diferença no tempo de infusão.

Sobotta, Pinho e Oliveira (2016), realizaram a análise de um chá obtido a partir da infusão aquosa do hibisco por meio 5 g de cálice seco e 200 mL de água à temperatura de 80

°C, com repouso por 15 min, seguido de filtração. Os autores obtiveram um teor de polifenóis totais de  $37,4 \pm 0,09$  mEqG.g<sup>-1</sup> (miliequivalente de ácido gálico).

O teor de antocianinas monoméricas, no chá de hibisco, variou de 0 a 85,9 mg delfinidina 3-sambubiosídeo/L (Tabela 4). Em um estudo realizado por Piovesana (2016), para a extração, identificação, quantificação e microencapsulamento por atomização e liofilização de compostos bioativos dos cálices de hibisco, as antocianinas representam a maior parcela dos compostos nos cálices de hibisco, sendo elas a delfinidina 3-sambubiosídeo e cianidina 3-sambubiosídeo, com  $218,17 \pm 12,69$  e  $70,42 \pm 5,26$  mg/100 g massa fresca, esses valores representam 41% e 13% do total de compostos fenólicos. Já em uma análise realizada por Oboh (2008), apontam valores de 13,3 mg/g<sup>-1</sup>, em extratos aquosos de cálices de *H. sabdariffa*, que foram obtidos a partir da extração de 1g de cálice em 100 mL de água quente por 5 minutos.

Outro estudo realizado por Barbosa *et al.* (2020), para quantificar o teor de antocianinas monoméricas em *H. sabdariffa* os autores usaram 3 marcas de cálice seco de hibisco. A infusão foi elaborada com a adição de 1,25 g de cálices secos e 250 mL de água, a 90 °C por 15 min. O teor de antocianinas monoméricas, determinada pelo método do pH diferencial, variou de 24 a  $50 \pm 0,0$  mg/L mL, quantidade menor do que a obtida neste estudo, no qual em condições semelhantes de 90 °C por 20 minutos foi obtido um teor de 75,03 mg delfinidina 3-sambubiosídeo/L. Variações como essa podem ocorrer devido a proporção do sólido e solvente, uma vez que esse é um fator que também afeta no teor de compostos obtidos.

Além disso, Januário *et al.* (2018), com o objetivo de avaliar o processo de extração e estabilidade de um chá de hibisco, determinaram o teor de antocianinas. Os autores prepararam o chá utilizando 5 g de cálice, 200 mL de água a temperatura de 75 °C e tempo de 15 minutos para a extração a quente e para extração frio utilizaram água a 25 °C por um tempo de 2 horas. Os chás foram armazenados a 4 °C e analisados durante 4 semanas. O teor de antocianinas foi maior quando a extração foi feita a 75 °C (66,02 mg Cianidina-3-glicosídeo/g) do que a 25 °C (34,96 mg Cianidina-3-glicosídeo/g) na primeira semana de análise. Estes dados mostram que a temperatura e o tempo de infusão são fatores que afetam na extração dos compostos do cálice de hibisco, já que o maior teor obtido para o chá quente. A temperatura é um fator que facilita a extração pois aumenta a solubilidade e a difusão dos componentes que serão extraídos, um tempo de extração adequado também auxilia na extração de quantidade adequada de compostos (XU; CHANG, 2007).

Jabeur *et al.* (2017), quantificaram o teor de antocianinas em infusões aquosas de cálices secos de hibisco a 100 °C por 5 minutos, utilizando 500 mg de cálices secos e 100 mL de água destilada. Também realizaram extração hidroetanólica a partir de 1 g de amostra macerada com

30 mL de etanol/água (80:20 v/v), 25 °C a 150 rpm por 1 h. Desse modo, obtiveram um teor de antocianinas totais de  $12,3 \pm 0,3$  mg/g de extrato para a infusão aquosa, no qual  $7,0 \pm 0,2$  mg/g de extrato são referentes a delphinidina-3-O sambubiosídeo. Para a extração hidroetanólica, obtiveram um teor de  $12,96 \pm 0,06$  mg/g de extrato, no qual  $7,03 \pm 0,04$  mg/g é referente a delphinidina-3-sambubiosídeo. Os autores obtiveram valores bastante elevados em comparação com o presente estudo, essas variações ocorrem devido a diferenças na metodologia empregada. Além disso, percebe-se que o uso de solventes distintos promove uma extração mais ou menos eficiente. Desse modo, pode-se deduzir que solvente é algo que também possui alta influência na quantificação de compostos orgânicos como a antocianina, sendo estes solúveis em água e em solventes orgânicos polares (PEREIRA; NASCIMENTO, 2016).

No estudo apresentado por Maciel *et al.* (2012), utilizaram 400 g de cálice de hibisco para 1000 mL de solvente alcoólico por 15 dias, obtiveram um resultado de  $85,9 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$  de antocianinas no extrato. Ainda, em análises realizadas por Almeida (2017), sobre a quantificação de antocianinas em cálices de hibisco, os extratos aquosos foram preparados por meio da infusão, 400,09 g de cálice seco processados em 2,0 L de água destilada a 80 °C durante 1 h e posteriormente liofilizadas, sendo que o perfil e quantificação de antocianinas foi determinado por Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os autores quantificaram a delphinidina-3-sambubiosídeo (0,524 mg/mL) e cianidina-3-glicosídeo (0,225 mg/mL). Piovesana e Norena (2019), quantificaram e determinaram as principais antocianinas totais encontradas em cálice de hibisco, Delphinidina 3-sambubiosídeo (4,0355 a 7,5157 mg/g b.s) e Cianidina 3-sambubiosídeo (1,4207 a 2, 5683 mg/g b.s), indicativo de que a antocianina que está presente e em maior quantidade no chá de hibisco é a Delphinidina 3-sambubiosídeo.

### **5.3 Efeito da temperatura e tempo no teor de conteúdo fenólicos totais e antocianinas monoméricas no chá de hibisco**

A partir da estimativa do conteúdo fenólico total do chá de hibisco (*H. sabdariffa*), analisou-se o efeito do tempo e temperatura na função-resposta investigada. De acordo com a análise de regressão e variância (ANOVA) para o teor de conteúdo fenólicos (Tabela 6), observou-se que o termo linear foi significativo para a variável  $x_1$  (temperatura) e  $x_2$  (tempo). Os termos da interação  $x_1 \cdot x_2$  não foram significativos. O modelo para estimar o teor de conteúdo fenólicos pode ser descrito como  $Y_1 = 21,9 + 6,9 \cdot x_1 + 4,3 \cdot x_2$ . A função-resposta  $Y_1$  (teor de compostos fenólicos) apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,87, indicando que o modelo se ajustou adequadamente aos dados experimentais (Tabela 6).

Tabela 6 – Análise de Variância (ANOVA) dos modelos obtido pela aplicação da metodologia de superfície de resposta aos dados experimentais

Fator	Grau de liberdade	SS	F	P
<b>y<sub>1</sub> = Teor de compostos fenólicos totais</b>				
X <sub>1</sub>	1	284,0064	33,65740	0,000663
X <sub>2</sub>	1	111,1982	13,17801	0,008396
Erro	7	59,0671		
<b>y<sub>2</sub> = Teor de antocianinas monoméricas</b>				
X <sub>1</sub>	2	5508,374	37,03640	0,002625
X <sub>2</sub>	1	598,934	8,05405	0,046964
X <sub>1</sub> * X <sub>2</sub>	2	1883,318	12,66278	0,018605
Erro	4	297,457		

x<sub>1</sub> e x<sub>2</sub> são os níveis codificados de X<sub>1</sub> (temperatura em °C) e X<sub>2</sub> (tempo em h) variáveis independentes. SS= soma dos quadrados. Valor de p = significativo abaixo de 0,05.

Fonte: Autoria própria (2022).

No gráfico de superfície de resposta (Figura 9) observa-se que, com o aumento da temperatura (X<sub>1</sub>) e do tempo (X<sub>2</sub>), o chá de hibisco apresentou maior teor de compostos fenólicos.

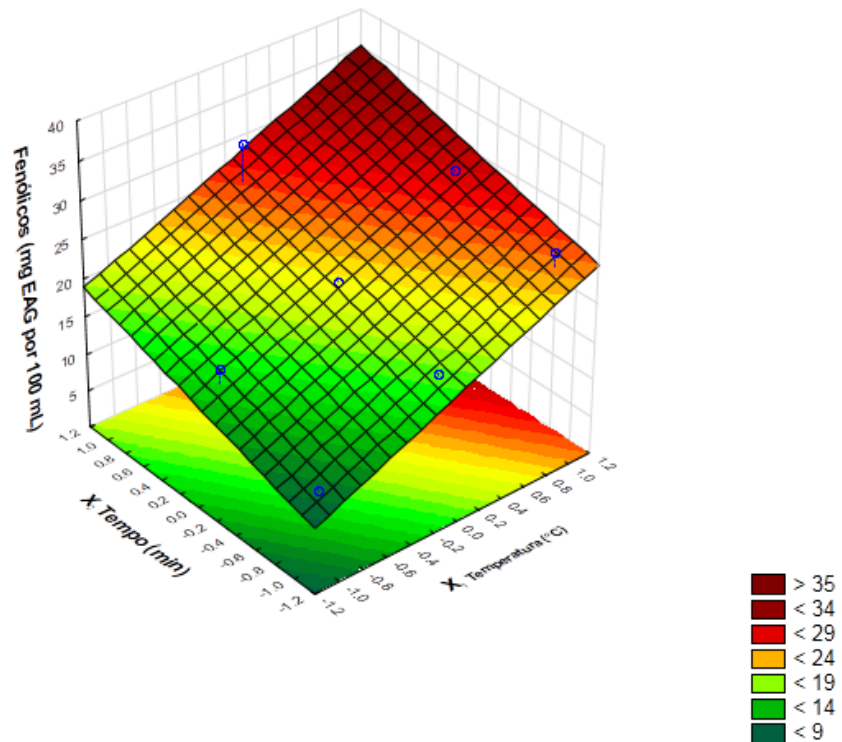


Figura 9 – Superfície de resposta gerada para o teor de compostos fenólicos totais, em função da temperatura de infusão ( $x_1$ ) e tempo de infusão ( $x_2$ ) do cálice de *H. sabdariffa*  $x_1 = -1$  (60 °C), 0 (75 °C) e +1 (90 °C);  $x_2 = -1$  (5 min), 0 (20 min) e +1 (35 min).

Os resultados do delineamento experimental e gráfico de superfície de resposta permitem observar a influência significativa dos parâmetros escolhidos nas variáveis resposta. Quando a infusão foi realizada no nível máximo das variáveis independentes ( $x_1:1$ ;  $X_1:90$  °C) e tempo ( $x_2:1$ ;  $X_2:35$  min) obtiveram o maior teor de extração de compostos fenólicos (30,79 mg EAG/100mL). Isso ocorre devido à maior solubilização dos compostos quando a temperatura é elevada, uma vez que temperaturas maiores favorecem a penetração do solvente na matriz, processo que facilita a transferência de massa e conseqüentemente se obtém uma maior extração (CARDENAS-TORO *et al.*, 2015). Estudos adicionais são necessários para indicar se as condições de tempo e temperatura investigadas promoveram a máxima extração de compostos fenólicos.

Em uma análise realizada por Azza, Ferial e Esmart (2011), para a extração de compostos fenólicos de cálices de hibisco foram usados diferentes solventes etanol acidificado com HCl 1,5N/L (85:15, v/v), etanol acidificado com ácido cítrico 1%, solução de ácido cítrico em concentração de 2% e água destilada, perceberam que etanol acidificado com 1% de extrato de ácido cítrico para a extração de compostos fenólicos apresentou maior concentração de fenólicos totais que os demais solventes o conteúdo fenólico total foi (43,06 mg/g como ácido



gálico) e o menor teor obtido foi utilizando água destilada, 38,39 mg/g como ácido gálico, valor que ficou relativamente próximo ao obtido por esse estudo. Diante disso, é notável que a polaridade dos solventes afeta a extração dos compostos fenólicos. Segundo Del-Ré e Jorge (2011), a extração de compostos fenólicos é bastante influenciada pela polaridade dos reagentes utilizados, ou seja, quanto maior a polaridade do solvente, maior será a quantidade de compostos fenólicos extraídos. Isto pode influenciar na solubilidade dos extratos em água, uma vez que se fossem utilizadas solventes mais polares poderiam se obter maiores teores extraídos. Por outro lado, a infusão aquosa do cálice de hibisco pode ser ingerida pelas pessoas na forma de chá, o que poderia não ser possível pela adição de outros compostos que melhorem a extração.

Para quantificar o teor de antocianinas monoméricas totais no chá de hibisco (*H. sabdariffa*) verificou-se o efeito do tempo e temperatura na função-resposta investigada. De acordo com a análise de regressão e variância (ANOVA) para o teor de antocianinas (Tabela 5), percebeu-se que os termos foram significativos para a variável  $x_1$  (temperatura) e  $x_2$  (tempo). Os termos da interação  $X_1.X_2$  foram significativos. O modelo para estimar o teor de antocianinas totais pode ser descrito como  $Y_2 = 45,8 + 29,8.x_1 + 4,5.x_1^2 + 9,9.x_2 + 6,8.x_1^2.x_2 - 13,1.x_1^2.x_2^2$ . A função-resposta  $Y_2$  (teor de antocianinas totais) apresentou coeficiente de determinação ( $R^2$ ) de 0,96, indicando que o modelo se ajustou adequadamente aos dados experimentais.

No gráfico de superfície de resposta (Figura 10) observa-se que, com o aumento da temperatura ( $X_1$ ) e do tempo ( $X_2$ ), o chá de hibisco apresentou maior teor de antocianinas.

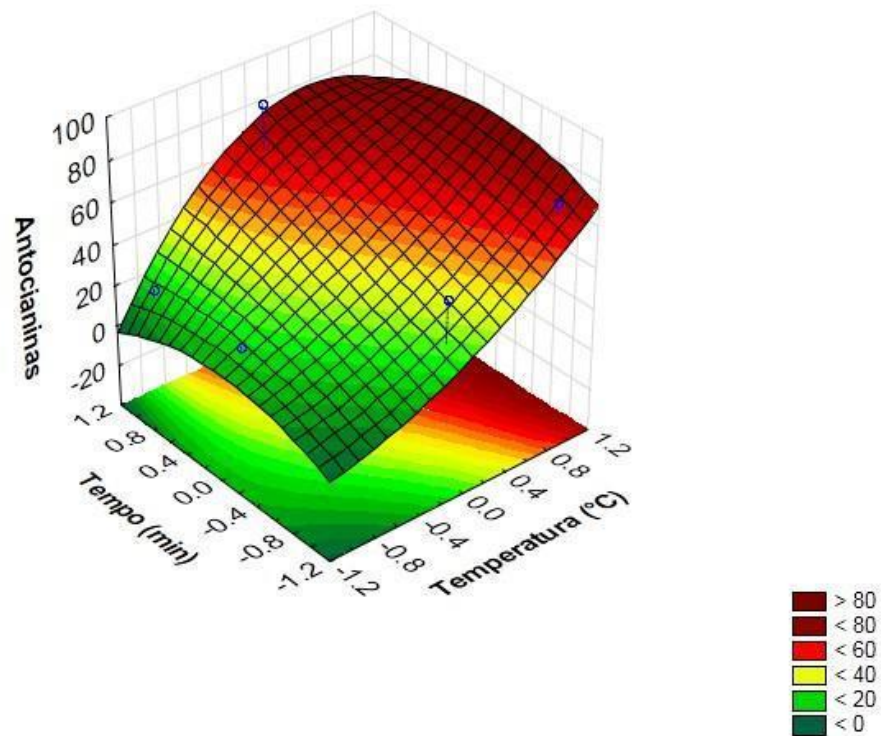


Figura 10 – Superfície de resposta gerada para o teor de antocianinas, em função da temperatura de infusão ( $x_1$ ) e tempo de infusão ( $x_2$ ) do cálice de *H. sabdariffa*  $x_1 = -1$  (60 °C), 0 (75 °C) e +1 (90 °C);  $x_2 = -1$  (5 min), 0 (20 min) e +1 (35 min).

No entanto, os resultados do delineamento experimental mostraram que a partir de um determinado ponto, o gráfico começa a apresentar uma curvatura indicando declínio na extração de antocianinas, esse fato indica que as antocianinas são sensíveis a determinadas condições de extração e isso influencia na quantidade de antocianinas no que é extraída no chá de hibisco. Nesse sentido, o maior teor extraído foi 85,9 mg delphinidina 3-sambubiosídeo/L, e foi obtido em um ponto intermediário, temperatura ( $x_1:0$ ;  $X_1:75$  °C) e tempo ( $x_2:1$ ;  $X_2:35$  min).

Os dados obtidos nesses experimentos indicam que em condições mais elevadas de temperatura e tempo, pode ocorrer a degradação das antocianinas. Isso ocorre porque quanto maior a temperatura aplicada na solução de extração antocianinas, maior é a sua degradação. Além da temperatura, a degradação é ainda mais acentuada quando se aumenta o pH do meio, já que são mais estáveis em condições ácidas (STRINGHETA, 1991). Desse modo, Lopes *et al.* (2007) concluiu que a estabilidade da cor das antocianinas é afetada por diversos fatores como pH, copigmentação, luz, temperatura, metais e oxigênio.

Em um estudo realizado por Azza, Ferial e Esmart (2011), para a extração de pigmentos naturais (antocianinas) de cálices de hibisco foram usados diferentes solventes (etanol acidificado com HCl 1,5N/L (85:15, v/v), etanol acidificado com ácido cítrico 1%, solução de ácido cítrico em concentração de 2% e água destilada) e o maior teor obtido foi de 1386

mg/100g Cianidina 3-glucosídeo utilizando etanol acidificado com 1,5 N/L HCl (85: 15) e o solvente que obteve menor extração foi a água destilada com um teor de 545.39 mg/100g Cianidina 3-glucosídeo, neste caso o etanol acidificado com HCl 1,5N/L (85:15, v/v foi o melhor solvente. Já para Sampaio (2008), o melhor solvente para extrair antocianinas é o metanol, mas sua utilização não é interessante quando se elabora um produto para consumo humano, como é o caso do chá de hibisco. Desse modo, Gómez-Plaza *et al.* (2006), destacam que a água e solventes hidroalcológicos são os mais indicados para a obtenção de corantes ou produtos antioxidantes que serão destinados à indústria alimentícia.

Com o aumento da temperatura e tempo de infusão, era esperado aumento na extração de compostos fenólicos, devido ao aumento na permeabilidade das paredes celulares e consequente aumento de solubilidade e a difusão dos componentes. De forma geral, neste estudo, condições mais elevadas de tempo e temperaturas promovem maior teor de compostos bioativos no chá de hibisco, embora seja conhecido que condições elevadas destas variáveis possam causar a degradação dos compostos fenólicos e antocianinas. Assim, para definir a melhor condição de infusão para o chá de hibisco, aplicou-se o perfil de desejabilidade que avalia os resultados obtidos pelo modelo matemático das funções-respostas ( $Y_{estimado}$ ). O maior teor de compostos bioativos foi obtido quando o chá foi elaborado com infusão a 90 °C por 35 minutos.

## **6 CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos mostraram que, considerando as variáveis investigadas, a melhor condição para realizar a infusão do cálice de hibisco foi 90 °C por 35 minutos. Essa condição de infusão favoreceu a extração de teores de compostos fenólicos e antocianinas, possivelmente sem degradá-los. Diante disso foi possível estabelecer uma condição de preparo do chá de hibisco que é possível de ser realizada industrialmente e também pelo consumidor, melhorando as propriedades benéficas associadas ao consumo dessas bebidas. Estudos complementares podem ser realizados para otimizar a extração de compostos bioativos do cálice de hibisco, incluindo o efeito das variáveis proporção sólido: líquido, solventes e granulometria do cálice.

## REFERÊNCIAS

- ABREU, B. B.; SOUSA, C. R. N.; PASSOS, J. C.; MARINHO, A. R. S.; BRANDÃO, A. C. A. S.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Composição centesimal, compostos bioativos e atividade antioxidante em cálice de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Jornal Interdisciplinar de Biociências**, v. 4, n. 1, p. 1, 2020.
- AJAY, M.; CHAI, H. J.; MUSTAFA, A. M.; GILANI, A. H.; MUSTAFA, M. R. Mechanisms of the anti-hypertensive effect of *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 109, p. 388– 393, 2007.
- AJOKU, G. A.; OKWUTE, S. K.; OKOGUN, J. I. Isolation of Hexadecanoic Acid Methyl Ester and 1,1,2-Ethantetricarboxylic Acid- 1 Hydrox 1, 1-Dimethyl Ester from the Calyx of Green *Hibiscus Sabdariffa* (Linn). **Natural Products Chemistry and Research**, v. 3, p. 169, 2015.
- ALARCON-AGUILAR, F. J.; ZAMILPA, A.; PEREZ-GARCIA, M. D.; ALMANZA-PEREZ, J. C.; ROMERO-NUNEZ, E.; CAMPOS-SEPULVEDA, E. A.; VAZQUEZ-CARRILLO, L. I.; ROMANRAMOS, R. Effect of *Hibiscus sabdariffa* on obesity in MSG mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 114, p. 66– 71, 2007.
- ALI, B. H.; MOUSA, H. M.; EL-MOUGY, S. The effect of a water extract and anthocyanins of *Hibiscus sabdariffa* L. on paracetamol induced hepatotoxicity in rats. **Phytotherapy Research, London**, v.17, p. 56–59, 2003.
- ALI, B. H.; AL WABEL, N.; BLUNDEN, G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L. **A review. Phytotherapy Research**, v. 19, n. 5, p. 369–375, 2005.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.; ROBARDS, K. & RYAN, D. Sample preparation in the determination of phenolic compounds in fruits - Review. **Analyst**, Australia, 125, p. 989-1009, 2000.
- AOAC. **Official Methods of Analysis of AOAC International** - Volume I and II, 18th Edition, Rev. 1, 2006.
- AZZA, A. ABOU-ARAB; FERIAL M. ABOU-SALEM; ESMAT A. ABOU-ARAB. Physico-chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from Roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*). **Academia - Journal of American Science**, Egito, v. 7, 2011.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p.191-203, 2006.

BARATA, A. M.; ROCHA, F.; LOPES, V.; CARVALHO, A. M. Conservation and sustainable uses of medicinal and aromatic plants genetic resources on the worldwide for human welfare. **Industrial Crops and Products**, v. 88, p. 8-11, 2016.

BARBOSA, D. R. R.; BOYARSKI, D. R. S.; MACENA<sup>1</sup>, T. F. S.; CLEMENTE, R. C. Quantificação de compostos fenólicos, poder antioxidante e teor de açúcares em infusão e extrato solúvel de *Hibiscus Sabdariffa* L. **Revista Desafios**, v. 7, n. 2, 2020.

BHATTACHARYA, U.; MUKHOPADHYAY, S.; GIRI, A. K. Comparative antimutagenic and anticancer activity of three fractions of black tea polyphenols thearubigins. **Nutrition and Cancer** v. 63, p. 1122–1132, 2011.

BORRÁS-LINARES, I.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; ARRÁEZ-ROMAN, D.; PALMEROS-SUÁREZ, P. A.; DEL VAL-DÍAZ, R.; ANDRADE-GONZÁLES, I.; SEGURA-CARRETERO, A. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). **Industrial Crops and Products**, v. 69, p. 385–394, 2015.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº 267, de 22 de setembro de 2005 – Aprova o regulamento técnico de espécies vegetais para o preparo de chás. Ministério da Saúde/Agência Nacional de Vigilância Sanitária/Diretoria Colegiada. **Diário Oficial da União. Brasília**, 22 de setembro de 2005.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BROUILLARD, R. The in vivo expression of anthocyanins colour in plants. **Phytochemistry**, v. 22, p. 311-323, 1983.

CAMILLO, J. **Vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.)**. Disponível em: <https://www.aplantadavez.com.br/2015/05/vinagreira-hibiscus-sabdariffa-l.html>. Acesso em: 18 ago. 2021.

CARAMEZ, R. R. B. **Caracterização físico-química e estudo da estabilidade das antocianinas do cálice de *Hibiscus sabdariffa* L.** Florianópolis, 1999, 70 f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina. Disponível em: <https://repositorio.ufsc.br/xmlui/handle/123456789/80593>. Acesso em: 17 jul. 2021.

Cardenas-Toro, F. P. ; Alcázar-Alay, S. C. ; Coutinho, J. P. ; Godoy, H. T. ; Forster-Carneiro, T. ; Meireles, M. A. A. Pressurized liquid extraction and low-pressure solvent extraction of carotenoids from pressed palm fiber: Experimental and economical evaluation. **Food and bioproducts processing** v. 94, p. 90–100, 2015.

CASSOL, L. **Extração de compostos bioativos do hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) por micro-ondas e seu encapsulamento por atomização e liofilização.** 2018. 128 p. Dissertação ( Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2018. Disponível em <https://lume.ufrgs.br/handle/10183/179787>. Acesso em: 15 jul. 2021.

CHANG, Y-C.; HUANG, K-X.; HUANG, A-C.; HO, Y-C.; WANG, C-J. Hibiscus anthocyanins-rich extract inhibited LDL oxidation and oxLDL mediated macrophages apoptosis. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 44, p. 1015– 1023, 2006.

CHANG-CHE, CHEN, FEN-PI, CHOU, YUNGCHYAN, HO, WEA-LUNG, LIN, CHIN-PIN, WANG, ERL-SHYH, KAO. Inhibitory effects of *Hibiscus sabdariffa* L. extract on low-density lipoprotein oxidation and anti hyperlipidemia in fructose-fed and cholesterol-fed rats. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Washington, v. 84, n. 15, p. 1989– 1996, 2004.

CIPLAM. **O chá de hibisco tem propriedades antioxidantes.** 2017. Disponível em: <https://ciplamasces.wordpress.com/2017/05/19/o-cha-de-hibisco-com-propriedades-antioxidantes/>. Acesso em: 03 jun. 2021.

CORRALES, M.; TOEPFL, S.; BUTZ, P.; KNORR, D.; TAUSCHER, B. Extraction of anthocyanins from grape by-products assisted by ultrasonics, high hydrostatic pressure or pulsed electric fields: A comparison. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 9, n. 1, p. 85–91, 2008.

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

DE ALMEIDA, P. S. **Avaliação da atividade antioxidante, antimicrobiana, citotóxica e genotóxica do extrato aquoso de cálices de *Hibiscus Sabdariffa* Linn.** Tese (Graduação em farmácia). 82p. Rio de Janeiro. UEZO, 2017. Disponível em: <http://www.uezo.rj.gov.br/tcc/farmacia/Priscila-Santana-de-Almeida.pdf>. Acesso em: 25 jan. 2022.

DEL-RÉ, P. V.; JORGE, N. Antioxidant potential of oregano (*Oreganum vulgare* L.), basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.): application of oleoresins in vegetable oil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 31, n. 4, p. 955-959, 2011.

FAROMBI, E. O.; IGE, O. O. Hypolipidemic and antioxidant effects of ethanolic extract from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* in alloxan-induced diabetic rats. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, Strasbourg, v. 21, p. 601–609, 2007.

FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; RODRÍGUEZ-MEDINA, I. C.; BELTRÁN-DEBÓN, R.; PASINI, F.; JOVEN, J., MICOL, V.; SEGURA- CARRETERO, A.; FERNANDEZ-GUTIÉRREZ, A. Quantification of the polyphenolic fraction and in vitro antioxidant and in vivo anti-hyperlipemic activities of *Hibiscus sabdariffa* aqueous extract. **Food Research International**, v. 44, p. 1490-5, 2011.

FIGUEROA PÉREZ, M, G.; ROCHA-GUZMÁN, N, E; MERCADO-SILVA, E; LOARCA-PIÑA, G; REYNOSO-CAMACHO, R. Effect of chemical elicitors on peppermint (*Mentha piperita*) plants and their impact on the metabolite profile and antioxidant capacity of resulting infusions. **Food Chemistry**, v. 156, p. 273–278, 2014.

FONSECA, K, T. **Cerveja Artesanal Adicionada De Hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.): Determinação da atividade antioxidante e compostos fenólicos**. Dissertação (Mestrado em Nutrição: Ciência dos Alimentos). 51p. Recife. UFPE, 2020. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/37852>. Acesso em: 15 jun. 2021.

FORMAGIO, A.; RAMOS, D.; VIEIRA, M.; RAMALHO, S. R.; SILVA, M. M.; ZÁRATE, N. A. H.; CARVALHO, J. E. Phenolic compounds of *Hibiscus sabdariffa* and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, p. 69–75, 2015.

FRANCIS, F. J. Food Colorants: anthocyanins. **Critical Review of Food Science and Nutrition**, v. 28, p. 273-314, 1989.

FRANCIS, F. J. Anthocyanins and betalains: composition and applications. **Cereal Foods World**, v. 45, p. 208-213, 2000.

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

GÓMEZ-PLAZA, E.; MIÑANO, A.; LÓPEZ-ROCA, J.M. Comparison of chromatic properties, stability and antioxidant capacity of anthocyanin-based aqueous extracts from grape pomace obtained from different vinification methods. **Food Chemistry**, v. 97, n. 1, p. 87-94, 2006.

GUINDANI, M.; TONET, F.; KUHN, F.; DAL MAGRO, J.; DALCANTON, F.; FIORI, M. A.; MELLO, J. M. M. Estudo do processo de extração dos compostos fenólicos e antocianinas totais do *Hibiscus sabdariffa*. In: Congresso Brasileiro de Engenharia Química, 2014. **Anais...** Florianópolis, 2014.

HARBORNE, J.B.; BAXTER, H.; MOSS, G.P. *Phytochemical Dictionary: A Handbook of Bioactive Compounds from Plants*. 2. Ed. London: Academic Press, 1989.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietary flavonoids: intake, health effects and bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 937-942, 1999.

HOLLMAN, P.C.H.; KATAN, M.B. Dietary Flavonoids: Intake, Health Effects and Bioavailability. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, p. 937-42, set-out. 1999.

HOU, D-X.; TONG, X.; TERAHARA, N.; LUO, D.; FUJII, M. Delphinidin 3-sambubioside, a Hibiscus anthocyanin, induces apoptosis in human leukemia cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 440, p. 101–109, 2005.

ISMAIL, A.; IKRAM, E. H. K.; NAZRI, H. S. M. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds nutritional composition protein quality and health benefits. **Food**, v. 2, n.1, p. 1–16, 2008.

JABEUR, I.; PEREIRA, E.; BARROS, L.; CALHELHA, R.C.; SOKOVIC, M.; OLIVEIRA, M.B.P.P.; FERREIRA, I.C.F.R. *Hibiscus sabdariffa* L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. **Food Research International**, v. 100, p. 717–723, 2017.

JANUÁRIO, J. G. B.J.; PARAISO, C. M.; MADRONA, G. S. Compostos bioativos de chá de *Hibiscus sabdariffa* L. e seus aspectos tecnológicos. In: 27 ° Encontro Anual de Iniciação Científica. , **Anais...** Maringá, 2018.

JORGE, L. I. F.; INOMATA, E. I.; MAIO, F. D.; TIGELA, P. Características de duas hortaliças do Brasil: “chaguinha” (*Tropaeolum majus* L.) e “vinagreira” (*Hibiscus sabdariffa* L.) **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 86- 96, 1994.

KIM, J-K.; SO, H.; YOUN, M-J.; KIM, H-J.; KIM, Y.; PARK, C.; KIM, S-J.; HA, Y-A.; CHAI, K-Y.; KIM, S-M.; KIM, K-Y.; PARK, R. *Hibiscus sabdariffa* L. water extract inhibits the adipocyte differentiation through the PI3-K and MAPK pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 114, p. 260– 267, 2007.



KONG, J.; CHIA, L.; GOH, N.; CHIA, T.; Brouillard, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 64, p. 923-933, 2003.

KOUAKOU, T. H.; KONKON, N. G.; AYOLIE, K.; OBOUAYEBA, A. P.; ABEDA, Z. H.; KONE, M. Anthocyanin Production in Calyx and Callus of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) and its Impact on Antioxidant Activity. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 4, n. 3, p. 9-15, 2015.

LIAZID, A.; GUERRERO, R. F.; CANTOS, E.; PALMA, M.; BARROSO, C. G. Microwave assisted extraction of anthocyanins from grape skins. **Food Chemistry**, v. 124, n. 3, p. 1238–1243, 2011.

LIN, H-H.; CHEN, J-H.; KUO, W-H.; WANG, C-J. Chemopreventive properties of *Hibiscus sabdariffa* L. on human gastric carcinoma cells through apoptosis induction and JNK/p38 MAPK signaling activation. **ChemicoBiological Interactions**, Limerick, v. 165, p. 59– 75, 2007.

LIN, T.; LIN, H-H.; CHEN, H-C.; LIN, M-C.; CHOU, M-C.; WANG, C-J. Hibiscus sabdariffa extract reduces serum cholesterol in men and women. *Nutrition Research*, Amsterdam, v. 27, p. 140– 145, 2007.. Observations on the mechanism of iron absorption. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 27, n. 3 p. 140-145, 2007.

LIU, J. Y. The protective effects of *Hibiscus sabdariffa* extract on CCl<sub>4</sub>-Induced liver brosis in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 44, p. 336-343, 2006.

LIU, R. H. Whole grain phytochemicals and health. **Journal Cereal Science**, v.46, p.207-219, 2007.

LOPES, T. J.; XAVIER, M. F.; QUADRI, M. G. N.; QUADRI, M. B. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Revista Brasil Agrociência**, Pelotas, v.13, n.3, p. 291-297, jul-set, 2007.

LÓPEZ, C. J.; CALEJA, C.; PRIETO, M. A.; BARREIRO, M. F.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Optimization and comparison of heat and ultrasound assisted extraction techniques to obtain anthocyanin compounds from *Arbutus unedo* L. fruits. **Food Chemistry**, v. 264, p. 81–91, 2018.

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

- LUTHRIA, D. L.; MUKHOPADHYAY, S.; KWANSA, A. L. A systematic approach for extraction of phenolic compounds using parsley (*Petroselinum crispum*) flakes as a model substrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. Beltsville, v. 86, p. 1350–1358, 2006.
- MACIEL, M. J.; PAIM, M.P.; CARVALHO, H.H.C.; WIEST, J.M. Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 71, n. 3, p. 462-70, 2012.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. da. Antocianinas em suco de uva: composição e estabilidade. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Minas Gerais, v.24, n.1, p. 59-82, jan/jun. 2006.
- MARÇO, P, H.; POPPI, R, J.; SCARMINIO, I, S. Procedimentos analíticos para a identificação de antocianinas presentes em extratos naturais. **Química Nova**, v. 31, n. 5, 2008.
- MARQUES, C.; DUTHOIT, M.; ALVARENGA, B.; ROSEIRO, L. B. Implementação e validação do método de Folin-Ciocalteu para a determinação do teor em compostos fenólicos totais – aplicação a extratos de flor de cardo e queijo. **IP Beja**, Beja, v. 46, p.24, 2004.
- MERKEN, H.M.; BEECHER, G.R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 577-99, 2000.
- MOJIMINIYI, F. B. O.; DIKKO, M.; MUHAMMAD, B. Y.; OJOBOR, P. D.; AJAGBONNA, O. P.; OKOLO, R. U.; IGBOKWE, U. V.; MOJIMINIYI, U. E.; FAGBEMI, M. A.; BELLO, S. O.; ANGA, T. J. Antihypertensive effect of an aqueous extract of the calyx of *Hibiscus sabdariffa*. **Fitoterapia**, Amsterdan, v. 78, p. 292–297, 2007.
- MONROY-ORTIZ, C.; CASTILLO-ESPANA P. **Plantas medicinales utilizadas en el estado de morelos**. México, p. 405. 2007.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of chromatography A**, v. 1054, n. 1-2, p. 95-111, 2004.
- NGUYEN, Q, V.; CHUYEN, H, V. Processing of herbal tea from roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.): Effects of drying temperature and brewing conditions on total soluble solid, phenolic content, antioxidant capacity and sensory quality. **Beverages**, v. 6, n. 1, p. 1–11, 2020.

NUNES, S. P.; THOMAS, A. B.; LIMA, L. CA. de O. **Compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante em chá de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.)**. In: XXIII Congresso de Pós - Graduação Da UFLA., **Anais...** 2014, Lavras, 2014.

OBOH, G. The neuroprotective potential of sour (*Hibiscus sabdariffa* calyx) and green (*Camellia sinensis*) teas on some pro-oxidant induced oxidation stress in brain. **Asian Journal of Clinical Nutrition**, v. 1, n. 1, p. 40-49, 2008.

OBOUAYEBA, A. P.; DJYH, N. B.; DIABATE, S.; DJAMAN, A. J. N.; GUESSAN, J. D.; KONE, M.; KOUAKOU, T. H. Phytochemical Analysis, Purification and Identification of Hibiscus Anthocyanins. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 156-168, 2015.

OLATUNDE, F. E.; FAKOYA, A. Free radical scavenging and antigenotoxi activities of natural phenolic compounds in dried flower of *Hibisco Sabdariffa* L. **Molecular Nutrition and reser and**, v. 49, p. 1120-1128, 1790.

ONYENEKWE, P. C.; AJANI, E. O.; AMEH, D. A.; GAMANIEL, K. S. Antihypertensive effect of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyx infusion in spontaneously hypertensive rats and a comparison of its toxicity with that in Wistar rats. **Cell Biochemistry and Function**, Cambridge, v. 17, n. 3, p. 199–206, 1999.

OLVERA-GARCIA, V.; CASTAÑO-TOSTADO, E.; REZENDIZ-LOPEZ, R. I.; REYNOSO-CAMACHO, R.; GONZÁLEZ DE MEJÍA, E.; ELIZONDO, G.; LOARCA-PIÑA, G. Hibiscus sabdariffa L. extracts inhibit the mutagenicity in micro suspension assay and the proliferation of HeLa cells. **Journal of Food Science**, v.73, p.75-81, 2008.

OLIVEIRA, C. A.; DE SOUZA, P. E.; POZZA, E. A.; PINTO, J. E. B. P.; BARRETTI, P. B. Progresso da seca da haste (*Botrytis cinerea*) do hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) em quatro épocas e dois métodos de plantio. **Summa phytopathol**, v. 39, n. 2, jun. 2013

PARAÍSO, C, M.; JANUÁRIO J, G, B.; SANTOS. S, S.; MIZUTA. A, G.; MADRONA, G, S. Determinação do teor antioxidante e características microbiológicas em chás de *hibiscus sabdariffa* L. In: 6º Simpósio de Segurança Alimentar., **Anais...** 2018, Gramado, 2018.

PANIZZA, S. Plantas que curam: cheiro de mato. 18 ed. São Paulo: **IBRASA**, 1997.

PEDRO, A, C.; GRANATO, D.; ROSSO, N, D. Extraction of anthocyanins and polyphenols from black rice (*Oryza sativa* L.) by modeling and assessing their reversibility and stability. **Food chemistry**, v. 191, p. 12-20, 2016.

PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A. Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, n. 3, p. 340–372, 2010.

PEREIRA, R. J., NASCIMENTO, G. N. L. **Compostos bioativos vegetais**. UNIVERSIDADE FEDERAL DO TOCANTINS, Palmas/TO, 142 p. 2016. Disponível em: [https://www.researchgate.net/profile/LuciaGratao/publication/318447495\\_Phenolic\\_compounds/links/5ef62c5aa6fdcc4ca431a8cf/Phenolic-compounds.pdf](https://www.researchgate.net/profile/LuciaGratao/publication/318447495_Phenolic_compounds/links/5ef62c5aa6fdcc4ca431a8cf/Phenolic-compounds.pdf). Acesso em: 14 mar. 2022.

PINHEIRO, C. U.B. Extrativismo, cultivo e privatização do jaborandi (*pilocarpus microphyllus stapf ex holm. rutaceae*) no Maranhão, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, Brasília, v. 16, n. 2, 2002.

PINELA, J.; PRIETO, M. A.; PEREIRA, E.; JABEUR, I.; BARREIRO, M. F.; BARROS, L.; FERREIRA, I. C. F. R. Optimization of heat- and ultrasound-assisted extraction of anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* calyces for natural food colorants. **Food Chemistry**, v. 275, p. 309–321, 2019.

PIOVESANA, A. **Extração, identificação, quantificação e microencapsulamento por atomização e liofilização de compostos bioativos dos cálices de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.)**. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). 60p. Porto Alegre. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2016.

PIOVESANA, A.; NORENA, C. P. Z. Study of Acidified Aqueous Extraction of Phenolic Compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces. **The Open Food Science Journal**, v. 11, p. 25-34, 2019.

PURBOWATI, I. S. M.; MAKSUM, A. The antioxidant activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* Linn) phenolic compounds in different variations microwave-assisted extraction time and power. **Series: Earth and Environmental Science**, v. 406, 2019.

RAMAKRISHNA, B.; JAYAPRAKASHA, G.; JENA, B. S.; SINGH, R. Antioxidant activities of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) calyces and fruit extracts. **Journal of Food Science and Technology**, v. 45, p. 223-227, 2008.

REIN, M. J. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. **Dissertation**. EKT series 1331. University of Helsinki, **Department of Applied Chemistry and Microbiology**, 2005.

RIBEIRO, A. Â. M.; MARTINS, D, H, N.; CIBIN, G. R.; SILVEIRA, D.; MAGALHÃES, P, O.; FONSECA-BAZZO, Y. M. *Hibiscus sabdariffa* l.: estabilidade da atividade antioxidante e

constituintes químicos após preparo do chá. **Infarma Ciências Farmacêuticas**, Brasília, v.30, n. 2, p.102-109, 2018.

ROCHA, L. S. S.; CABRAL, L. I. A.; PIO, P. B. de S.; OLIVEIRA, R. M. C.; COUTINHO, L. C.; de ALMEIDA, D. M. P. F. Análise da toxicidade de infusões de chás de emagrecimento através do teste *Allium cepa*. **Revista Biotecnologia e Ciência**, Uruguai, v. 6, n. 1, p. 55-62, 2017.

ROSA, E. da S. **Características nutricionais e fitoquímicas em diferentes preparações e apresentações de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco, vinagreira, rosela, quiabo-de-angola, caruru-da-guiné)** - Malvaceae. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Nutrição) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Porto Alegre, 2013. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/87222>. Acesso em: 22 jun. 2021.

SAMPAIO, P.G. **Otimização da extração, esterilização e identificação de antocianinas obtidas a partir de frutas**. 2008. 141 p. Dissertação (Mestrado em Química). UNICAMP, Campinas. 2008. Disponível em: [https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/CAMP\\_a4863911bb5437cfc35699d9c1f3eacf](https://bdtd.ibict.br/vufind/Record/CAMP_a4863911bb5437cfc35699d9c1f3eacf). Acesso em: 25 jan. 2022.

SCHWARTZ, S. J.; VON E.; GIUSTI, M. M. Corantes. In: DAMODARAN S.; PARHIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos**, 4 ed. p. 445-498, Porto Alegre: Artmed, 2010.

SILVA, L. C, M.; SILVA, C. R.; SANTOS, S. A.; BELLO, K. M. G. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina. v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010.

SILVEIRA, T. F. F.; MEINHART, A. D.; BALLUS, C. A.; GODOY, H. T. The effect of the duration of infusion, temperature, and water volume on the rutin content in the preparation of mate tea beverages: An optimization study. **Food Research International**, v. 60, p.241–245, 2014.

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

SINGLETON, V.L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R.M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Oxidants and Antioxidants**, Part A, v. 299, p. 152-178, 1999.

SOARES, M.; WELTER, L.; KUSKOSKI, E. M.; GONZAGA, L.; FETT, R. Compostos Fenólicos e atividade antioxidante da casca de uvas Niágara e Isabel. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v, 30, n. 1, p. 59-64, 2008.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Revista Nutrição**, Campinas, v.15, n. 1, p. 71-81, jan./abr. 2002.

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

STRINGHETA, P. C. **Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv)**. 1991. 149p. Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/255326>>. Acesso em: 13 jul. 2018.

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

TSENG, T. H.; KAO E. S.; CHU, C. Y.; CHOU, F. P.; LIN, W.; WANG, C. J. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 35, p. 1159-64, 1997.

TSENG, T-H.; HSU, J-D.; LO, M-H.; CHU, C-Y.; CHOU, F-P.; HUANG, C-L.; WANG, C-J. Inhibitory effect of Hibiscus protocatechuic acid on tumor promotion in mouse skin. **Cancer Letters**, Shannon, v. 126, p. 199–207, 1998.

WANG, M. L.; MORRIS, B.; TONNIS, B.; DAVIS, J.; PEDERSON, G. A. Assessment of oil content and fatty acid composition variability in two economically important *Hibiscus* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 26, p. 6620–6626, 2012.

WASIK, R. A sweet new alternative. (sucralose, a derivative of table sugar). **Food in Canada**, v. 51, n. 6, p. 27-31, jun. 1991.

WROLSTAD, R. E. Manual de química analítica de alimentos. Pigmento, corantes, sabores, textura, e componentes alimentos bioativos. **Wiley-Interscience**, Hoboken, Nova Jersey, v.2.

WRIGHT, C. I.; VAN-BUREN, L.; KRONER, C. I.; KONING, M. M. G. Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 114, p. 1–31, 2007.

XU, B. J.; CHANG, S. K. C. A comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, 2007.