



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA TERRA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA APLICADA

**AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE BIOATIVOS
FENÓLICOS EM CÁPSULAS CONTENDO *HIBISCUS*
COMERCIALIZADAS NO BRASIL**

BÁRBARA ANE SOUSA DOS SANTOS

Salvador - Bahia

2022

BÁRBARA ANE SOUSA DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE BIOATIVOS
FENÓLICOS EM CÁPSULAS CONTENDO *HIBISCUS*
COMERCIALIZADAS NO BRASIL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada da Universidade do Estado da Bahia para obtenção do título de Mestre em Química Aplicada.

Orientadora: Profa. Dra. Débora de Andrade Santana

Co-orientador: Prof. Dr. Aníbal de Freitas Santos Júnior

Salvador - Bahia

2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Sistema de Bibliotecas da UNEB

S237a	<p>Santos, Bárbara Ane Sousa dos</p> <p>AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE BIOATIVOS FENÓLICOS EM CÁPSULAS CONTENDO HIBISCUS COMERCIALIZADAS NO BRASIL / Bárbara Ane Sousa dos Santos, ***** - Salvador, 2022.</p> <p>110 fls : il.</p> <p>Orientador(a): Débora de Andrade Santana. Coorientador(a): Aníbal de Freitas Santos Júnior.</p> <p>Inclui Referências</p> <p>Dissertação (Mestrado Acadêmico) - Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências Exatas e da Terra. Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada - PGQA, Campus I. 2022.</p> <p>1.Cápsulas. 2.Hibisco. 3.Quimiometria. 4.Box-Behnken. 5.Compostos fenólicos.</p>
	CDD: 543

**AVALIAÇÃO DA EXTRAÇÃO E DETERMINAÇÃO DE BIOATIVOS
FENÓLICOS EM CÁPSULAS CONTENDO *HIBISCUS*
COMERCIALIZADAS NO BRASIL**

BÁRBARA ANE SOUSA DOS SANTOS

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Débora de Andrade Santana (Orientadora)
Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Prof. Dr. Aníbal de Freitas Santos Júnior (Co-orientador)
Universidade do Estado da Bahia – UNEB

Profa. Dr. Fábio de Souza Dias (Membro Externo)
Universidade do Estado da Bahia - UFBA

Prof. Dr. Milleno Dantas Mota (Membro Interno)
Universidade do Estado da Bahia - UNEB

Dedico este trabalho a Deus por ter me dado a vida e ter colocado nela o melhor pilar que eu poderia ter, a minha família. Agradeço as minhas mães Delzuita (*in memoriam*), e Tânia, minha avó Maria Renê, minha irmã Gislene e aos meus amigos mais chegados que irmãos, por todo apoio ao longo dessa jornada.

“Lembre-se que as pessoas podem tirar
tudo de você, menos o seu
conhecimento.”

Albert Einstein

AGRADECIMENTOS

A Universidade do Estado da Bahia (UNEB), pelo fornecimento da infraestrutura necessária para realização da pesquisa, e aos funcionários do Prédio Especial de Química, por toda prestatividade.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química Aplicada (PGQA), em especial ao Grupo de Pesquisa e Desenvolvimento em Química Analítica (GPDQA), a minha orientadora professora Débora e aos colegas Bárbara Elisabeth, Geovani, Hebert, Isaac e Monique, por todo apoio prestado durante a execução do projeto.

Ao Grupo de Pesquisa em Biofarmácia e Medicamentos, especialmente ao meu Co-orientador professor Aníbal e a Laura, por toda disponibilidade ao longo das etapas do trabalho.

A todos meus amigos que se fizeram presentes nessa minha longa jornada, emanando energias positivas de forma direta ou indireta, em especial a Leidiana, minha amiga e irmã científica, que me incentivou e apoiou de uma forma inexplicável.

A minha família, por todas as palavras de incentivo, disponibilidade e acalento, sem o apoio de vocês eu não teria conseguido chegar até aqui.

Acima de tudo, agradeço a Deus por ter me dado forças e ter colocado ao meu redor pessoas que me impulsionam e estimulam a continuar mesmo com todos os percalços enfrentados.

RESUMO

Drogas vegetais encapsuladas vêm sendo utilizadas no tratamento ou prevenção de doenças associadas ao estresse oxidativo, o que se atribui à presença de compostos bioativos. O *hibiscus* é um exemplo de droga vegetal, pertencente ao gênero de plantas da família Malvaceae, que possui benefícios relacionados a saúde, conferidos pela existência de compostos fenólicos que atuam como agentes antioxidantes. Muitos trabalhos quantificam o teor e caracterizam o perfil fenólico de amostras de hibisco *in natura*, entretanto, apesar da grande utilização das cápsulas, até o presente momento não se encontra trabalhos explorando essa matriz. Uma avaliação de compostos bioativos em cápsulas de hibisco comercializadas em Salvador-Bahia, foi realizada com o emprego de ferramentas quimiométricas e análise de Metodologia de Superfície de Resposta (RSM) Box-Behnken, para entendimento da relação entre as variáveis: volume do meio, pH do meio e volume de eluente, sendo 333 mL, 2 e 2 mL, as respectivas condições otimizadas da dissolução. Através de testes físicos, verificou-se que a maioria das cápsulas atende aos critérios preconizados pela Farmacopeia brasileira e que os Teores de Fenólicos Totais (TPC) encontrados variam de 3.579 mgEqAg/100g a 4.947 mgEqAg/100g. Empregando-se a extração em fase sólida (SPE) após a dissolução, constatou-se um aumento na sensibilidade da técnica de análise, a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de arranjos de diodo (HPLC-DAD), sendo possível identificar a presença de 13 compostos fenólicos: ácidos gálico, protocatecuico, clorogênico, cafeico, sinrínico, *p*-cumárico, ferúlico, elágico e *trans*-cinâmico, bem como catequina, vanilina, rutina e naringenina. Ferramentas de análises exploratórias dos dados, como Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) e Análise de Componentes Principais (PCA), demonstraram a formação de dois grupos presentes entre as amostras e a influência de alguns analitos na separação.

Palavras-chave: cápsulas, hibisco, quimiometria, Box-Behnken, compostos fenólicos.

ABSTRACT

Encapsulated plant drugs have been used in the treatment or prevention of diseases related to oxidative stress, which is attributed to the presence of bioactive compounds. Hibiscus is an example of a plant drug, belonging to the genus of plants of the Malvaceae family, which has health-related benefits, conferred by the existence of phenolic compounds that act as antioxidant agents. Many quantify the content and characterize the phenolic profile of Hibiscus *Exhibition in natura*, however, despite the wide use of capsules, until now, there are no works exploring this matrix. An evaluation of bioactive compounds in hibiscus capsules in Salvador-Bahia, was carried out using chemometric tools and analysis of Response Surface Methodology (RSM) Box-Behnken, to understand the relationship between the variables: volume of the medium, pH of the medium and eluent volume, being 333 mL, 2 and 2 mL, according to optimized tolerance conditions. Through physical tests, it was confirmed that most capsules meet the criteria recommended by the Brazilian Pharmacopoeia and that the Total Phenolic Contents (TPC) found range from 3,579 mgEqAg/100g to 4,947 mgEqAg/100g. Using the transmission in continuous phase (SPE) after the exciting one, an increase in the sensitivity of the analysis technique, the High Performance Liquid Chromatography with diode array detector (HPLC-DAD), was verified, making it possible to identify the presence of 13 phenolic compounds: gallic, protocatechuic, chlorogenic, caffeic, syringic, *p*-coumaric, ferulic, ellagic and *trans*-cinnamic, as well as catechin, vanillin, rutin and naringenin. Exploratory data analysis tools, such as Analysis of Hierarchical Clusters (HCA) and Principal Component Analysis (PCA), created the formation of two groups present in the sample and the influence of some analytes in the separation.

Keywords: capsules, hibiscus, chemometrics, Box-Behnken, phenolic compounds.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Flores de Hibiscus dos gêneros: A) radiatus Willd; B) acetosella Welw; C) sabdariffa L.; e D) cannabinus.....	16
Figura 2 Flores de Hibiscus dos gêneros: A) rosa-sinensis; B) (Dyer) Hook. f.....	20
Figura 3 Estrutura básica dos flavonoides	23
Figura 4 Estrutura básica das antocianinas	24
Figura 5 Estrutura química geral de derivados do ácido benzoico	25
Figura 6 Estrutura química do ácido cinâmico.....	25
Figura 7 Processo de desintegração da cápsula de hibisco	44
Figura 8 Dissolução das cápsulas de hibisco.....	45
Figura 9 Processo de extração em fase sólida.....	47
Figura 10 Reação do ácido gálico com molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu	51
Figura 10 Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2^3	58
Figura 12 Gráfico de Pareto do Teor de Fenólicos Totais.....	62
Figura 13 Superfícies de resposta e contorno para as respostas em função das variáveis: A) pH e volume do meio, B) volume do eluente e volume do meio e C) pH e volume do eluente	65
Figura 14 Gráfico de probabilidade normal dos resíduos para resposta	67
Figura 15 Cromatograma da amostra com os analitos identificados nos comprimentos de onda de 260 – 360 nm	69
Figura 16 Perfil de dissolução para as amostras in natura de hibisco.....	74
Figura 17 Perfil cromatográfico de produtos comerciais contendo hibisco na forma de cápsulas (sobreposições 260 nm - 360 nm): A) FITPI; B) FITPII; C)SMNUT; D) MTCMT.	80
Figura 18 Perfil cromatográfico de produtos comerciais contendo hibisco na forma de cápsulas (sobreposições 260 nm - 360 nm): A) HIBMIX; B) CMBFIT	81

Figura 19 Dendrograma obtido pela Análise Hierárquica de Componentes (HCA) de cápsulas de hibisco em relação as áreas analíticas obtidas com a integração dos picos cromatográficos identificados via HPLC-DAD	84
Figura 20 Gráfico de autovalor obtido pela Análise de Componentes Principais (PCA) de cápsulas de hibisco em relação as áreas analíticas obtidas com a integração dos picos cromatográficos identificados via HPLC-DAD	85
Figura 21 Diagrama de dispersão e de loadings para PCs 1 e 2	89
Figura 22 Diagrama de dispersão e de loadings para PCs 1 e 3	90
Figura 23 Cromatogramas de amostras de hibisco com regiões de máxima absorção: A) 260 nm; B) 272 nm e C) 280 nm	92
Figura 24 Cromatogramas de amostras de hibisco com regiões de máxima absorção: A) 330 nm e B) 360 nm.....	93
Figura 25 Sobreposição de cromatogramas da amostra injetada sem SPE e após SPE	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Estudos que avaliam o teor de compostos bioativos em Hibiscus sabdariffa L.	31
Tabela 2 Gradiente de eluição e vazão	41
Tabela 3 Analitos com seus respectivos tempos de retenção e comprimento de onda	43
Tabela 4 Fatores e níveis empregados no planejamento Box-Behnken	50
Tabela 5 Códigos e descrição de cápsulas de hibisco	53
Tabela 6 Matriz do planejamento fatorial de dois níveis completo	56
Tabela 7 Matriz do planejamento experimental Box-Behnken	60
Tabela 8 Teor de Fenólicos Totais	61
Tabela 9 Coeficientes da regressão linear, desvio padrão dos coeficientes, valores de t e probabilidade estatística p dos coeficientes do modelo referente a dissolução de cápsulas de hibisco	63
Tabela 10 ANOVA dos efeitos calculados para matriz Box-Behnken	66
Tabela 11 Resultados da análise do peso médio de cápsulas de hibisco.....	71
Tabela 12 Teste de Tukey a 5% para ensaios de desintegração.....	72
Tabela 13 Teor de fenólicos totais em amostras comerciais.....	75
Tabela 14 Médias das áreas de analitos identificados em produtos comerciais contendo hibisco na forma de cápsulas	79
Tabela 15 Variância explicada e acumulada ao longo as componentes principais	86
Tabela 16 Fatores que avaliam a eficiência da separação cromatográfica do extrato com SPE	95
Tabela 17 Comparação das áreas de dos picos cromatográficos para amostras sem (1) e com SPE (2)	97

ABREVIATURAS E SIGLAS

DAD	Arranjos De Diodos
DBB	Box-Behnken
ECD	Detecção Eletroquímica
FLD	Detecção Fluorométrica
HCA	Análise Hierárquica De Componentes
HPE	Extração Líquido Pressurizado
HPLC-DAD	Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Com Detector De Arranjos De Diodo
HPLC-DAD-ESI-TOF-MS	Cromatografia Líquida De Alta Eficiência Com Detector De Arranjos De Diodo Acoplado Com Detector De Espectrometria De Massa
MAE	Extração Assistida Por Micro-ondas
MEF	Extração De Campo Moderado
PCA	Análise De Componentes Principais
PEF	Extração De Alta Pressão
PU	Espuma De Poliuretano
RMS	Metodologia De Superfície De Resposta
SFE	Extração De Fluido Supercrítico
SLE	Extração Sólido-Líquido
SPE	Extração Em Fase Sólida
TPC	Teor De Fenólicos Totais
UAE	Extração Assistida Por Ultrassom
UPLC	Cromatografia Líquida De Alta Performance

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 JUSTIFICATIVA	19
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1 Hibisco.....	20
3.2 Compostos bioativos	22
3.3 Bioativos fenólicos.....	23
3.4 Propriedades farmacológicas de bioativos fenólicos presentes no hibisco	26
3.5 Extração dos compostos bioativos	28
3.6 Encapsulamento, desintegração e dissolução	33
3.7 Espécies de hibisco relatadas em estudos de encapsulamentos de compostos bioativos	35
3.8 Métodos cromatográficos na análise de compostos fenólicos.....	36
3.8.1 Cromatografia Líquida	36
3.9 Quimiometria	37
4 OBJETIVOS	39
4.1 Objetivo geral	39
4.2 Objetivos específicos	39
5 MATERIAIS E MÉTODOS.....	40
5.1 Reagentes e soluções	40
5.2 Ensaio de desintegração	44
5.3 Teste e perfil de dissolução.....	45
5.4 Teste de uniformidade de doses unitárias.....	46
5.5 Extração em Fase sólida (SPE)	46
5.6 Otimização multivariada	47
5.6.1 Planejamento de dois níveis completo 2^3	48
5.6.2 Planejamento Box-Behnken	48
5.6.3 Fenólicos totais	50
5.6.4 Avaliação da eficiência de separação cromatográfica.....	52
5.6.5 Amostragem	53
5.7 Análise exploratória de dados	53

5.7.1 Análise de Agrupamentos Hierárquicos - HCA.....	54
5.7.2 Análise de Componentes principais - PCA.....	54
5.8 Softwares utilizados no tratamento dos dados	55
6 RESULTADOS E DISCUSSÕES	56
6.1 Otimização do método de dissolução.....	56
6.2 Teor de fenólicos totais das amostras de hibisco.....	60
6.3 Determinação das condições ótimas e validação do modelo matemático	63
6.4 Perfil cromatográfico das amostras de hibisco	68
6.5 Peso médio	70
6.6 Teste de desintegração	72
6.7 Teste e perfil de dissolução.....	73
6.8 Analitos identificados na análise de amostras de hibisco.....	77
6.9 Análise exploratória dos dados – HCA e PCA.....	82
6.1 Avaliação da eficiência da separação cromatográfica.....	91
7 CONSIDERAÇÕES FINAIS	98
8 PERSPECTIVAS	99
REFERÊNCIAS.....	100

1 INTRODUÇÃO

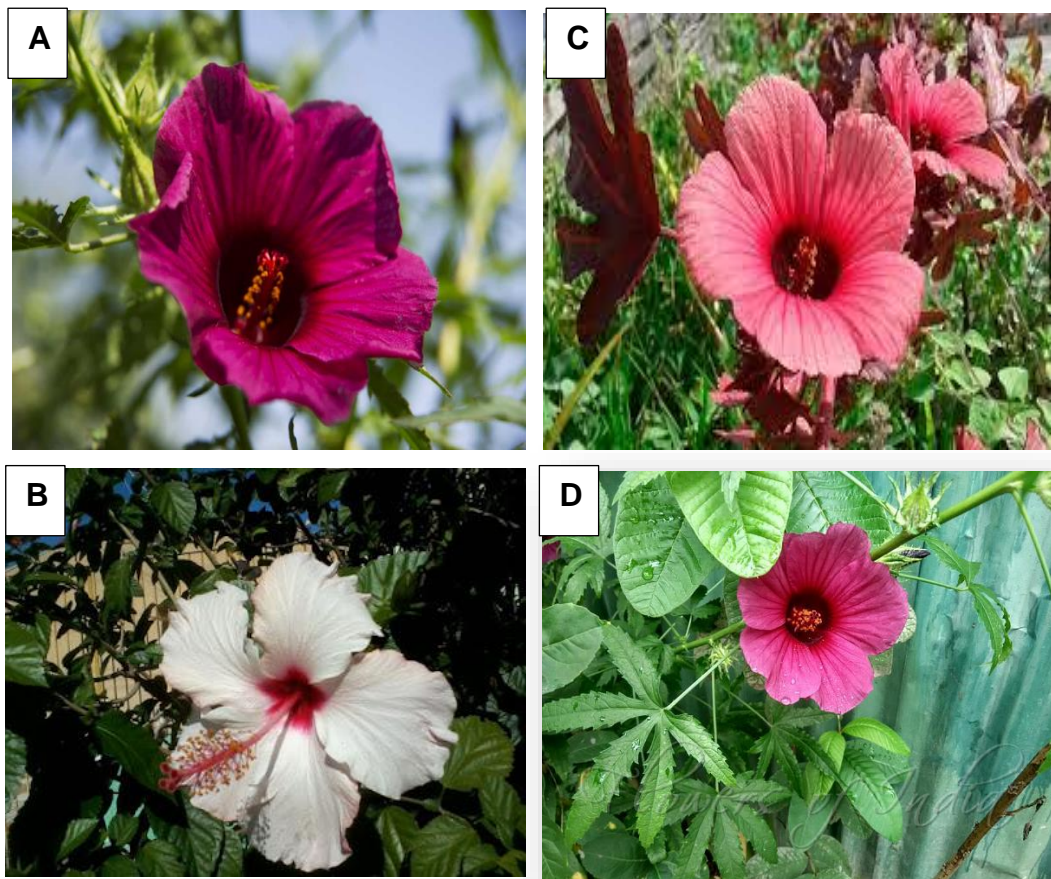
Drogas vegetais são partes de uma planta que após processo de colheita, estabilização e se necessário secagem, podem ser consumidas na íntegra, seccionadas, trituradas ou pulverizadas, estas possuem compostos bioativos, substâncias químicas que desempenham determinada ação terapêutica (BRASIL, 2014). Suas propriedades medicinais estão sendo associadas principalmente a presença de vitaminas e sais minerais e compostos biologicamente ativos como flavonoides e catequinas (BRAIBANTE *et al.*, 2014). Está sendo cada vez mais frequente a incorporação desses ingredientes naturais na indústria de alimentos funcionais, além de nutracêuticos e farmacêuticos (GÓMEZ-ALDAPA *et al.*, 2019a; MOURA *et al.*, 2019; SÁYAGO-AYERDI *et al.*, 2021), visando o fornecimento de antioxidantes, a inserção dietética de vitaminas, minerais, carboidratos, proteínas, ácidos graxos essenciais e não essenciais para promoção da saúde humana (DHAR *et al.*, 2015).

Aos antioxidantes atribui-se efeitos benéficos a saúde na prevenção de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, um dos fatores que atuam por exemplo, no desenvolvimento e progressão do diabetes mellitus (LIN *et al.*, 2016; PILLAI; MINI, 2016), dessa forma, com o seu consumo, verifica-se uma menor incidência de doenças crônicas, como diabetes tipo 2, doenças cardiovasculares e dislipidemias (SÁYAGO-AYERDI *et al.*, 2021). Nos vegetais, os antioxidantes principais são os polifenóis, estes têm sido propostos como suplementos alimentares eficientes também para o controle da hiperglicemia e complicações macrovasculares, como hipertensão e microvasculares ligadas a degradação oxidativa celular (LIN *et al.*, 2016).

Um gênero de plantas da família Malvaceae, o *Hibiscus*, vem se destacando enquanto fonte de compostos bioativos, este é um gênero de plantas que possui cerca de 300 espécies distribuídas por todo o mundo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; COELHO; AMORIM, 2019; SIM; NYAM, 2021; TAPEC *et al.*, 2021; NGUYEN *et al.*, 2022). Na América

do Sul ocorrem cerca de 40 espécies da seção *Furcaria*, que caracterizam-se pela presença de flores grandes e com cores vibrantes, sendo muito aplicada para ornamentação de jardins (COELHO; AMORIM, 2019), no Brasil, o gênero está representado por cerca de 33 espécies, 25 com ocorrência em todas as regiões brasileiras e 19 concentrando-se na região Centro-Oeste, incluindo o *Hibiscus radiatus* Willd (Figura 1A), *H. acetosella* Welw. ex Hiern (Figura 1B), *H. sabdariffa* L (Figura 1C) e *H. cannabinus* (Figura 1D), sendo que as três primeiras apresentam cultivo ornamental, as duas últimas aplicações alimentícias e a última na produção de fibras (COELHO; AMORIM, 2019).

Figura 1 Flores de Hibiscus dos gêneros: A) *radiatus* Willd; B) *acetosella* Welw; C) *sabdariffa* L.; e D) *cannabinus*.



Fonte: (RYU et al., 2017; CORDEIRO, 2022; DUENAS-LOPEZ, 2022; GBIF SECRETARIAT, 2022; FLORES, 2023).

Popularmente conhecido como Roselle, o *Hibiscus sabdariffa* L., é uma planta herbácea e arbustiva, muito utilizada na produção de alimentos, principalmente bebidas, chás, geleias, e como corante alimentar na fabricação de vinho e biscoitos, possuindo cálices ricos em antioxidantes, revelando efeitos antibacterianos, anti-inflamatórios, anticancerígenos e anti-hipertensivos devido a presença dos compostos bioativos, tais como ácidos fenólicos, antocianinas e carotenoides (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; SIM; NYAM, 2021; NGUYEN *et al.*, 2022). Normalmente todas suas partes são consumidas, as sementes são torradas e moídas para introdução em refeição e suas folhas e brotos consumidos crus ou cozidos (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014). O seu uso como remédio também é amplo, realiza-se infusões de seus cálices ou folhas devido ao seus efeitos diuréticos, coleréticos, febrífugos, hipotensores, também é fonte de fibra (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014).

O Kenaf, como é conhecido o *Hibiscus Cannabinus*, é uma outra planta do gênero, muito utilizada no Brasil, é uma espécie arbustiva com caule verde e amarelado, produz folhas simples, flores grandes em tom de amarelo-claro, pode atingir até 6 metros de altura (SIM; NYAM, 2021). Em geral o *hibiscus* ganha destaque na culinária (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; MOURA *et al.*, 2019) e também tem potencial de aplicação na indústria de pigmentos, visto que muitos dos corantes artificiais que são utilizados com o intuito de tornar alimentos mais atraentes, podem conter contaminantes cancerígenos e/ ou neurotóxicos para humanos. Como os estudos relatam, os pigmentos extraídos de cálice de hisbisco são ricos em antocianina, composto solúvel em água que em geral apresenta coloração vermelha, a depender do pH do sistema (DE MOURA *et al.*, 2022) e quando aplicados como corantes na indústria alimentícia, também contribuem com a incorporação de ingredientes com propriedades antioxidantes no alimento (MOURA *et al.*, 2019).

Sabe-se que a grande maioria de compostos bioativos são sensíveis à temperatura, umidade e presença de oxigênio, de tal forma, através de técnicas de encapsulamento é possível promover a proteção e liberação desses bioativos

em condições específicas, este é um processo físico que possibilita a proteção desses compostos por meio de um revestimento (MAR *et al.*, 2020). O encapsulamento de componentes alimentares por um biopolímero pode possibilitar o aumento da vida útil do produto, o mascaramento de odores ou sabores desagradáveis da maioria dos compostos fenólicos, uma vez que diversas vezes isso limita sua aplicação, bem como proporciona proteção contra a oxidação pela luz ou degradação enzimática (AKHTAR *et al.*, 2014; GÓMEZ-ALDAPA *et al.*, 2019a). Uma vez encapsulados, após seu consumo esses materiais podem ter seus ingredientes ativos liberados por alguns mecanismos como diluição, cisalhamento ou agitação (AKHTAR *et al.*, 2014).

O objetivo deste trabalho foi investigar a presença de bioativos fenólicos em amostras de *hibiscos* encapsulados, por meio da utilização de ferramentas quimiométricas para otimização do método de extração e pré-concentração com extração em fase sólida (SPE) e análise do perfil fenólico de cápsulas de *hibiscus* comercializadas sob a forma de suplementos alimentares na cidade de Salvador, no estado da Bahia, bem como avaliar a eficiência da separação cromatográfica. Por meio de métodos espectrométricos foi determinado o teor de compostos fenólicos totais (TPC) e por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência de Fase Reversa acoplada detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD) foi realizada a investigação de ácidos fenólicos e flavonoides comparativamente com perfis cromatográficos de padrões analíticos, dos analitos investigados.

2 JUSTIFICATIVA

Os estudos sobre compostos bioativos vêm crescendo significativamente nos últimos anos, pois atribuem-se a eles principalmente funções anti-inflamatórias, antitumorais, antivirais, antifúngicas e antibacterianas. O hibiscus é uma das plantas que possui esses efeitos benéficos associados a saúde, normalmente sendo consumido cru ou cozido, também é adquirido *in natura*, em cápsulas ou em pó.

Observa-se que tem sido crescente a comercialização e utilização de substâncias bioativas encapsuladas, talvez por conta da praticidade do dia a dia e por não possuir o sabor característico da planta, o que não agrada muitos consumidores, nesse sentido, sua utilização, ingestão, transporte e manuseio é facilitada. Bioativos encapsulados são matrizes até então não exploradas, estes classificam-se como aditivos alimentares, portanto, a análise deles se torna importante de forma a contribuir com informações referentes a qualidade dos produtos ofertados a população, bem como o desenvolvimento de pesquisa em matrizes ainda não referenciadas na literatura, visto que os trabalhos já realizados até o presente momento com essa planta, são direcionados a identificação e quantificação de compostos bioativos utilizando partes da planta como flores, folhas e caules.

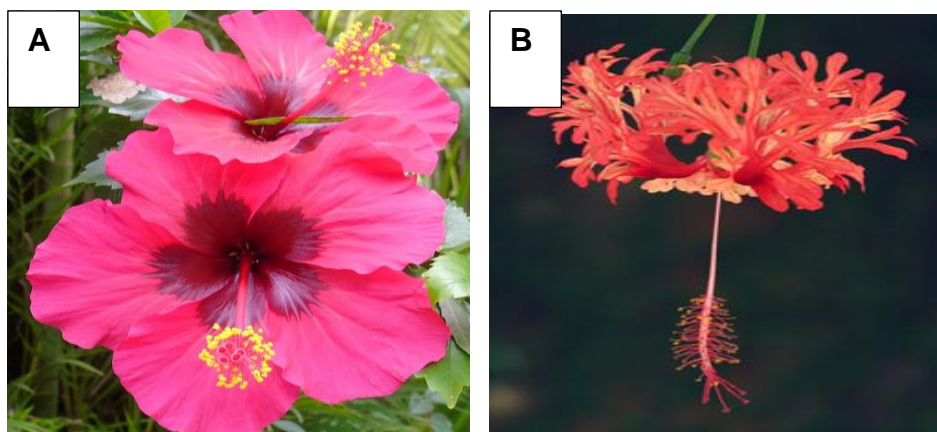
Para realização do trabalho utilizaram-se ferramentas quimiométricas, que empregam dados matemáticos e estatísticos para otimização das condições experimentais, auxiliando na escolha do planejamento a ser adotado, pois é possível avaliar a correlação entre variáveis simultaneamente, observando um todo, sem a necessidade da realização de grandes quantidades de ensaios experimentais, o que incluem muitas etapas e a possibilidade de inserção de erros experimentais durante a análise. No geral, a quimiometria visa facilitar a interpretação dos dados e identificar correlações implícitas entre as variáveis, por meio de dados multivariados, possibilitando a extração de informações químicas relevantes.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Hibisco

As plantas mais conhecidas no Brasil e utilizadas ornamentalmente são *H. rosa-sinensis* L. (popularmente conhecida como mimo-de-vênus, papoula, hibiscus-graxa, graxa-de-estudante, graxa-de-soldado e limpa-sapato) (Figura 2A) e *H. (Dyer) Hook. f.* (com nome popular de lanterna-japonesa, paraqueda e hibisco-crespo) (Figura 2B), outras como *H. acetosella* Welw. ex Hiern (conhecida como vinagreira, guaxima-de-jardim, groselheira), possuem o emprego em ornamentação, alimentação e medicina popular (ESTEVES; DUARTE; TAKEUCHI, 2014), sendo no Brasil empregada para fins ornamentais e também suas folhas são utilizadas no preparo de sucos, chás e saladas. Outras espécies como *H. cannabinus* (nomeada popularmente como cânhamo-brasileiro e papoula-do-são-francisco) (Figura 1D) e *H. sabdariffa* L. (chamada de quiabo-roxo, caruru-azedo e groselheira) (Figura 1C) são as duas principais espécies que são cultivadas distintamente e mais importantes economicamente dentro do gênero *Hibiscus* (DHAR *et al.*, 2015; MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022).

Figura 2 Flores de *Hibiscus* dos gêneros: A) *rosa-sinensis*; B) *(Dyer) Hook. f.*



Fonte: (LIM, 2014).

Utilizado na horticultura ornamental, o *Hibiscus*, possui partes como flores, cascas, raízes, folhas e sementes utilizadas para diversos fins, incluindo culinários, medicinais, industriais e como bioindicadores de poluição ambiental (PAOLETTI *et al.*, 2009; YEON *et al.*, 2019; JEFFERY; RICHARDSON, 2021; TAPEC *et al.*, 2021). Na culinária é utilizada como chás, geleias, suplementos alimentares, entre outros produtos, e seu uso medicinal inclui o tratamento de uma série de doenças, como abscessos, condições biliosas, câncer, tosse, fadiga, desconforto gastrointestinal, febre, veisalgia, distúrbios cardiovasculares, neurose, escorbuto, doenças do trato urinário (Yeon e *et al.* 2019; Jeffery e Richardson 2021; Borrás-Linares e *et al.* 2015); no Brasil, acredita-se que as raízes possuem propriedades estomacais, como no tratamento de úlceras (SIM; NYAM, 2021) e emolientes (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014). No geral, os benefícios para saúde humana do consumo de hibisco, centra-se principalmente para prevenção e tratamento de condições inflamatórias (JEFFERY; RICHARDSON, 2021).

O *Hibiscus sabdariffa* L., (*H. sabdariffa*) possui efeitos antioxidantes, hipotensores e antiateroscleróticos, muitos autores relatam que esses efeitos estão associados a sua composição rica em compostos fenólicos (MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022), seus benefícios à saúde são significativos, verificando-se que os seus extratos são comercializados como suplementos alimentares (CHEN *et al.*, 2013). Normalmente as folhas do *H. sabdariffa* L. são descartadas em todo o mundo, mas na África é consumida na preparação de sopas e molhos (CHEN *et al.*, 2013), as mesmas possuem um alto teor de polifenóis, demonstrando efeitos apoptóticos nas células câncer de próstata (LIN *et al.*, 2012), os extratos possuem altas taxas de antocianinas e já foi relatada sua utilização para diminuição de pressão arterial (AKHTAR *et al.*, 2014; JEFFERY; RICHARDSON, 2021). É relatado que os óleos produzidos a partir da semente de *Hibiscus Cannabinus* são ricos em ácidos graxos insaturados e em compostos bioativos, que são responsáveis pela sua atividade antioxidante (CHEW; TAN; NYAM, 2018), bem como apresenta efeito anti-hiperlidêmico, efeito na redução de massa corporal (JEFFERY; RICHARDSON, 2021). Os estudos em geral, têm concentrado os estudos nos benefícios associados ao combate de doenças inflamatórias (Pillai e

Mini 2016), efeito antibacteriano, efeitos no metabolismo lipídico (anti-colesterol), antidiabético, anti-hipertensivo (MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022), tratamento e prevenção de câncer (SIM; NYAM, 2021)

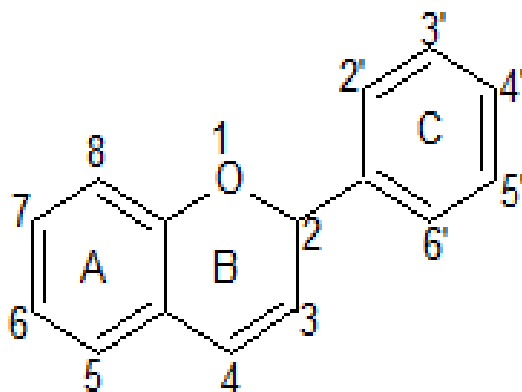
3.2 Compostos bioativos

Normalmente, plantas possuem várias classes de compostos bioativos relatados na prevenção e tratamento de enfermidades (JABEUR *et al.*, 2017), na composição do *hibiscus* há presença de proteínas, gorduras, carboidratos, ácidos, minerais, vitaminas (BORRÁS-LINARES *et al.*, 2015) e antioxidantes que são capazes de retardar ou impedir os processos de oxidação (BIOATI, 2009), normalmente doando seus elétrons aos radicais livres, os tornando espécies químicas estáveis que ao serem eliminadas, interrompem o estresse oxidativo, não ocasionando danos as células e conseqüentemente reduzindo o risco de doenças inflamatórias, a exemplo de síndromes metabólicas, câncer e doenças cardiovasculares (JEFFERY; RICHARDSON, 2021). O *H. sabdariffa* L. é rico em compostos bioativos como flavonoides, antocianinas e ácidos fenólicos, que são os principais constituintes relevantes no contexto farmacológico, além de apresentar taninos, polifenóis e polissacarídeos (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; BORRÁS-LINARES *et al.*, 2015; JEFFERY; RICHARDSON, 2021). Os polifenóis como flavonoides, ácidos fenólicos e taninos, são capazes prevenir o surgimento de complicações associadas ao diabetes a longo prazo, como doenças cardiovasculares, neuropatia, nefropatia e retinopatia. Eles inibem a α -glicosidase e a α -amilase, enzimas que interferem no metabolismo de carboidratos e lipídios, atenuando a hiperglicemia, dislipidemia e resistência a insulina, atuando no alívio de estresse oxidativo e processos inflamatórios (LIN *et al.*, 2016)

3.3 Bioativos fenólicos

Os compostos fenólicos possuem estruturas caracterizadas pela presença de um anel aromático com a substituição de pelo menos um átomo de hidrogênio por um grupo hidroxila, incluindo moléculas simples e complexas com alto grau de polimerização, que podem estar na forma livre ou glicosilada (SOARES, 2002), estes proporcionam efeitos de antienvhecimento, anti-inflamatório, antioxidante e antiproliferativo, no caso do *Hibiscus*, em especial os flavonoides, ácidos fenólicos e taninos (LIN *et al.*, 2016). É possível observar na Figura 3 a estrutura básica de um flavonoide, este é constituído por um núcleo fundamental com 15 átomos de carbono (C15), organizados em três anéis A, B e C (C6-C3-C6). Alterações nos radicais ligados ao anel C originam diversas classes dos flavonoides, a exemplo de catequinas e antocianidinas, flavonas, isoflavonas e flavanonas. No *H. sabdariffa* L. é descrita a presença de flavonoides como glicosídeos de quercetina e a gossipetina (BORRÁS-LINARES *et al.*, 2015; JEFFERY; RICHARDSON, 2021).

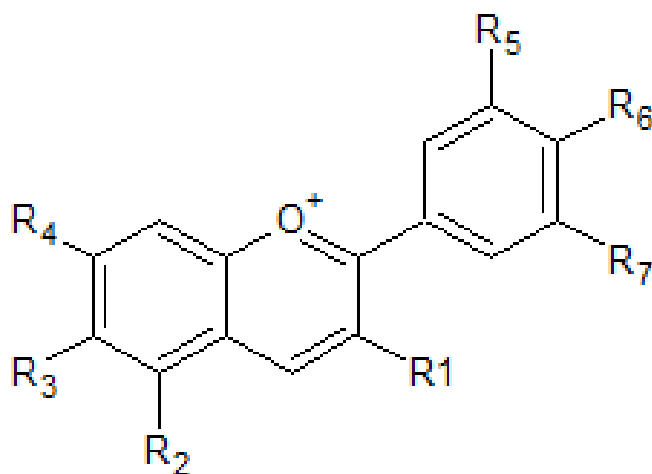
Figura 3 Estrutura básica dos flavonoides



Fonte: De autoria própria

As antocianinas são um subgrupo de flavonoides que aparecem em plantas principalmente na forma glicosilada como antocianidinas (SINDI; MARSHALL; MORGAN, 2014), sua estrutura básica está representada na Figura 4, esses compostos fenólicos são encontrados na maioria de flores e frutos que apresentam coloração roxo-avermelhada. É relatado que no *H. sabdariffa* L., há presença de cianidina-3-rutinosídeo, (Sindi, Marshall, e Morgan 2014; Jabeur e *et al.* 2017) delphinidina-3-glicosídeo, cianidina-3-glicosídeo, delphinidina-3-sambubiósido e cianidina-3-sambubiósido, responsáveis pela sua coloração característica, o que permite a sua utilidade na indústria alimentícia e farmacêutica (SINDI; MARSHALL; MORGAN, 2014; JABEUR *et al.*, 2017; MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022).

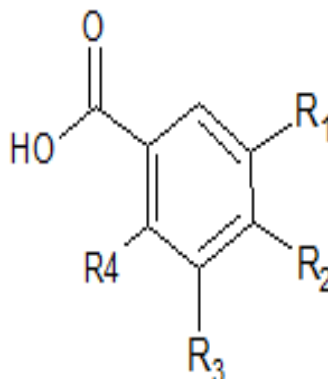
Figura 4 Estrutura básica das antocianinas



Fonte: De autoria própria

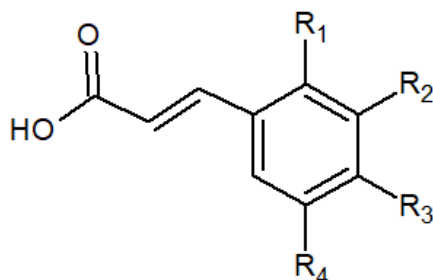
Os ácidos fenólicos se caracterizam pela presença de uma anel benzênico com um grupamento carboxílico, com a presença de um ou mais grupamentos hidroxila ou metoxila, o que confere a estes compostos propriedades antioxidantes (SOARES, 2002). Estes ainda podem ser divididos em dois grupos, os ácidos benzóicos que possuem sete átomos de carbono (C₆-C₁), conforme a Figura 5, e os ácidos cinâmicos que possuem nove átomos de carbono (C₆-C₃), ilustrado pela Figura 6, este último tipo é muito encontrado em vegetais.

Figura 5 Estrutura química geral de derivados do ácido benzoico



Fonte: De autoria própria

Figura 6 Estrutura química do ácido cinâmico



Fonte: De autoria própria

Os principais representantes dos ácidos benzoicos encontrado em *Hibiscus* são os ácidos gálico ($R_1, R_2, R_3 = \text{OH}, R_4 = \text{H}$), salicílico ($R_4 = \text{OH}, R_1, R_2, R_3 = \text{H}$); *p*-hidroxibenzoico ($R_2 = \text{OH}, R_1, R_3, R_4 = \text{H}$); protocatecuico ($R_1, R_2 = \text{OH}, R_3, R_4 = \text{H}$); vanílico ($R_1 = \text{OCH}_3, R_2 = \text{OH}, R_3, R_4 = \text{H}$) e sinríngico ($R_1, R_3 = \text{OCH}_3; R_2 = \text{OH}; R_4 = \text{H}$). Já os ácidos cinâmicos mais comuns relatados são os ácidos *p*-cumárico ($R_3 = \text{OH}, R_1, R_2, R_4 = \text{H}$); cafeico ($R_2, R_3 = \text{OH}, R_1, R_4 = \text{H}$); ferúlico ($R_2 = \text{OCH}_3; R_3 = \text{OH}; R_1, R_4 = \text{H}$) e sinápico ($R_2, R_4 = \text{OCH}_3, R_3 = \text{OH}; R_1 = \text{H}$).

Estudos relatam também a presença de ácidos orgânicos como cafeoilquínicos (ácido neoclorogênico e ácido criptoclorogênico), rutina, isoquercitrina, quercetina 3-sambubiósido, kaempferol 3-o-rutinosídeo, escopoletina e isômeros de hidroxicumarinas (MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022), além de taninos como o ácido elágico e o ácido gálico (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; PILLAI; MINI, 2016) e polissacarídeos como pectina e lignina (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; ANTONIADIS *et al.*, 2017). Na Tabela 1 constam alguns bioativos fenólicos comumente encontrados em *hibiscus* e suas respectivas atividades biológicas.

3.4 Propriedades farmacológicas de bioativos fenólicos presentes no hibisco

Os compostos fenólicos em geral possuem atividades antioxidantes, e além desse ponto em comum, pode-se observar que muitos apresentam efeitos anticancerígenos, a exemplo da catequina, naringenina, quercetina, ácidos elágico, *p*-hidroxibenzoico, ferúlico, clorogênico, sinríntrico e tânico, miricetina, kaempferol e rutina (CHAVES e *et al.*, 2022; CHU e *et al.*, 2021; LIN, Hui-Hsuan e *et al.*, 2012; PILLAI e MINI, 2016; SIM e NYAM, 2021). A catequina é um fenólico que atua alterando a expressão de genes responsáveis pela proliferação de células tumorais, angiogênese e apoptose (LIN, Hui-Hsuan e *et al.*, 2012), exercendo efeitos através da modulação de citocinas, moléculas de adesão e interação de células imunes com células endoteliais (CHEN e *et al.*, 2013) e devido a se comportar como antioxidante, inibe reações anti-inflamatórias, tratando doenças resultantes do dano oxidativo (CHU e *et al.*, 2021).

Já, a naringenina, tem atividade antiesclerótica e hepatoprotetora (CHAVES e *et al.*, 2022), o ácido elágico propriedades de antifibrose, e efeito anticancerígeno relatado no câncer de pele, esôfago, cólon e próstata (LIN, Hui-Hsuan e *et al.*,

2012), sequestrando radicais hidroxila quanto oxigênio e inibindo a peroxidação lipídica (CHEN e *et al.*, 2013; PILLAI e MINI, 2016) e o ácido tânico por sua vez, é redutor de atividade hepática e profilática para a doença de Alzheimer (SIM e *et al.*, 2019), além de ser um antimutagênico (CHU e *et al.*, 2021; MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022)). Efeitos antibacterianos são relatados em hibisco devido a presença dos bioativos naringenina e ácido clorogênico (CHAVES e *et al.*, 2022; PILLAI e MINI, 2016), antivirais, por conta do ácido cafeico, da miricetina e rutina, e antimicrobianos, por conta do ácido clorogênico e rutina (PILLAI e MINI, 2016; SIM e NYAM, 2021).

O ácido gálico possui capacidade de eliminar radicais livres, reduzindo o estresse oxidativo e diminuindo a tendência do corpo em desenvolver resistência à insulina (LIN, Derong e *et al.*, 2016), além dele, outros compostos fenólicos como a quercetina, ácidos protocatecuico, clorogênico, sinrínico, *p*-cumárico e *trans*-cinâmico, também possuem propriedades antidiabéticas já relatadas em estudos (CHU e *et al.*, 2021; DA-COSTA-ROCHA e *et al.*, 2014; LIN, Derong e *et al.*, 2016; PILLAI e MINI, 2016). Destaca-se que o ácido clorogênico e a quercetina atuam na redução de pressão arterial em pacientes com hipertensão leve (LIN, Derong e *et al.*, 2016) (CHU e *et al.*, 2021), estando o último fenólico possuindo ações antiplaquetárias e vasoprotetoras (CHU e *et al.*, 2021). Efeitos na prevenção de doenças cardiovasculares são atribuídas a presença de naringenina, ácidos ferúlico e *p*-hidroxibenzóico (CHAVES e *et al.*, 2022; PILLAI e MINI, 2016), que também atua contra a isquemia (CHU e *et al.*, 2021). Propriedades ansiolíticas são associadas ao ácido sinápico (CHU e *et al.*, 2021), e o mesmo, juntamente com a rutina, apresenta efeito protetor contra hepatotoxicidade (AKHTAR *et al.*, 2014; PILLAI; MINI, 2016).

No geral, os efeitos benéficos variados associados a saúde com a incorporação de hibisco como alimento funcional, estão diretamente relacionados a presença de alguns compostos fenólicos específicos (BORRÁS-LINARES *et al.*, 2015), e as suas ações antioxidantes contribuem para redução do estresse oxidativo e outras complicações correlatas.

3.5 Extração dos compostos bioativos

Normalmente, os compostos bioativos interagem com uma série de outros compostos, o que dificulta o processo de extração, dessa forma, visando métodos eficazes e ambientalmente amigáveis, as pesquisas recentes, concentram-se em técnicas de extração que incluem extração de campo elétrico moderado (MEF), campo elétrico pulsado (PEF), extração de alta pressão (HPE) ou extração líquido pressurizado (PLE) (PIMENTEL-MORAL *et al.*, 2020). Métodos de extração mais simples incluem a maceração que apresenta como desvantagem baixo rendimento e longo tempo de extração, além da extração por Soxhlet que tem a utilização de grandes quantidades de solventes orgânicos, muitas vezes tóxicos, além do alto consumo de energia e tempo (CASSOL; RODRIGUES, 2019; DEWI *et al.*, 2022). Observa-se que em temperaturas variando de 40°C a 60°C, atinge-se valores ótimos de extração para recuperação de antocianinas, bem como no intervalo de tempo de 1h a 4h (HAPSARI; MANIKHARDA; SETYANINGSIH, 2021).

A extração assistida por ultrassom (UAE) também é uma técnica que vem sendo empregada na extração de compostos bioativos de vegetais por oferecer alta reprodutibilidade, baixo consumo de reagentes, fácil manipulação e menor consumo de energia (REZAIE *et al.*, 2015). Extração com uso de solventes, como a UAE é relatada com potencial de extração de teor fenólico maior do que a convencional, resultando em melhor separação e recuperação dos compostos de interesse (CASSOL; RODRIGUES, 2019; DEWI *et al.*, 2022). Outros métodos de extração incluem solventes como a água, metanol, acetato de etila e hexano em diferentes combinações de temperatura, pH e tempo (CASSOL; RODRIGUES, 2019). A UAE é um dos métodos mais utilizados para extração fenólica de *H. sabdariffa*, sendo auxiliada por ondas ultrassônicas em frequências e amplitudes específicas que induzem a formação de bolhas de cavitação, que por sua vez ao colapsarem causam a transferência do analito para o solvente, os fatores como temperatura, tempo de extração e condições de frequência e potência do ultrassom normalmente são melhores em condições de 25°C a 65°C, 26 a 45 minutos, 40 kHz e 300 W, respectivamente (HAPSARI; MANIKHARDA; SETYANINGSIH, 2021).

Já na extração assistida por micro-ondas (MAE) utiliza-se aquecimento com radiação em frequência variando de 300 MHz a 300 GHz, onde a amostra é aquecida, ocasionando um aumento da energia de aquecimento para obtenção de uma extração eficiente, esse método é afetado pela energia de radiação, tempo de extração, temperatura, tipo de solvente e relação massa-solvente (HAPSARI; MANIKHARDA; SETYANINGSIH, 2021). Outro tipo de extração é a extração de fluido supercrítico (SFE), esta é realizada com a utilização de um gás acima do ponto crítico, que desempenha propriedades semelhantes a um líquido, mas que ainda assim mantém sua natureza de gás, os fatores com maior influência na SFE são o tipo de solvente de extração, a pressão e a temperatura (HAPSARI; MANIKHARDA; SETYANINGSIH, 2021)

Alguns autores citam a extração de compostos fenólicos com o emprego de extração em fase sólida (SPE) (BABAEI; DANESHFAR, 2016; FARAJZADEH *et al.*, 2022), visto que é uma técnica relativamente simples categorizada em etapas de adsorção e dessorção. A SPE é normalmente utilizada em análise de substâncias em matrizes que se encontram em níveis traço (ng g^{-1}), sendo constituída por um dispositivo preenchido com um sólido (sorvente), material escolhido com seletividade, capacidade sortiva/ adsortiva e estabilidade térmica, química ou mecânica aprimorada, para que na passagem da amostra possam ficar retidos os analitos alvo para posterior eluição com solventes. Os principais mecanismos de separação que envolvem analito e sorvente nos tipos de extração citados, são estabelecidos por processos físicos e químicos, como ligações de hidrogênio, interações dipolo permanente -dipolo permanente, dipolo permanente - dipolo induzido, dipolo induzido - dipolo induzido e interações iônicas, além de processos mecânicos, estando esses últimos baseados em adsorção, partição (fase normal e reversa), troca iônica e exclusão (ANDRADE-EIROA *et al.*, 2016). Essa técnica é utilizada para extração de analitos semi-voláteis e não voláteis de amostras líquidas, mas pode ser utilizada para amostras sólidas desde que estas sejam previamente extraídas com solvente (JARDIM, 2010). Dentre as fases sortivas na SPE, tem-se a possibilidade de aplicação de espuma de poliuretano (PU), que funciona como um meio de extração capaz de reter espécies químicas

orgânicas e inorgânicas em matrizes aquosas (HAN *et al.*, 2017), possui boas propriedades sortivas e mecânicas, além da vantagem de ser facilmente regenerada e possuir baixo custo. A espuma de PU é macroporosa e exibe propriedades mecânicas baixas devido a suas células abertas e flexíveis, é fácil de encontrar, apresenta boas propriedades química e térmica, é considerada um sorvente muito adequado para ser empregado nas técnicas de separação e em somativa apresentam grupos polares e apolares em sua estrutura podem reter uma variedade de substâncias (NOGUEIRA, 2012).

Explorando a Tabela 1, é possível perceber que normalmente a extração de compostos bioativos em *Hibiscus sabdariffa* L. é realizada com temperaturas variando de 18°C a 95°C, além disso, observa-se que as partes mais comuns do hibisco, usadas para extração de fenólicos são as folhas, caule e flores e os solventes mais comumente utilizados para extração são água destilada ou água ultrapura, metanol, etanol e combinação entre os solventes anteriores com ácidos, bem como solvente eutético a base de ácido cítrico (HAPSARI; MANIKHARDA; SETYANINGSIH, 2021).

E possível observar que um grande número de trabalhos se concentram no estudo do *Hibiscus sabdariffa* L., como verifica-se na Tabela 1, entretanto, outro estudo (RYU e *et al.*, 2017), avalia a presença de ácidos clorogênico, cafeico e seu isômero, gálico, *p*-hidroxibenzoíco, siríngico, *p*-cumárico, tânico e seu isômero, kaempferol glicosídeo, isoquercitrina, kaempferitrina, naringenina e seu isômero, vanilina, glicosídeo de miricetina, proantocianidina e seu isômero em folhas, cascas, flores e sementes de *Hibiscus cannabinus* L., utilizando metanol, água, etanol e clorofórmio por 60 minutos, e UPLC-UV e GS-MS como técnicas de análise, com tempo de corrida de 35 minutos.

Tabela 1 Estudos que avaliam o teor de compostos bioativos em *Hibiscus sabdariffa* L.

Parte da planta	Extração	Compostos fenólicos	Técnica de análise	Tempo de corrida (min)	LD e LQ	Referência
Cálices	Ácido acético e ácido cítrico a 35°C e 75°C, por 15 min e 60 min.	AG, AP, A25DHB, AS, AE, 2,4,6- THB, AB, ASA, AQ, ACH, ACF, ACL, A4OC, ACM, AC, AF e A34DC e A45DC, RUT, K3OG, MCT, QRC, KMP.	UPLC-DAD-MS UPLC-PDA	16	-	(ESCOBAR-ORTIZ <i>et al.</i> , 2021)
	Ácido clorídrico/ Metanol, por 1 hora a temperatura ambiente.	AHC, DHA, A3C, ACMN, A5C, A4C, A2OTCHC, isômero do AC, ACFN, ACMN, ACS, AFQN, AG, glicosídeo AP, AP, A3HB, A4HB, A4HF, AS, A3M4HF, A3HF e 3M4HFP. HAH, EDAH, MC, MG, EC, K3G, M3S, Q3S, Q3G, Q3OG, K3R, MEC, K3G, K3G, K3O6OG, MCT, S3OG, K3PC, QRC, KMP, D3S, DND, D3G, C3S, C3G e CND.	HPLC-ESI-QToF-MS	30	-	(SÁYAGO-AYERDI <i>et al.</i> , 2021)
	Etanol e água deionizada, por 20 minutos.	AP glicosídeo, ANC, AP, ACL, isômero de ACL II, ACQ, ADF4OG, ACS, isômero do ACSII e ASN, MDCM, ECG, isômero ECGII, isômero ECGIII, M3A, QS, Q3R, Q3G, MEC, MCT, QRC, C3S e PB.	HPLC-ESI-QTOF-MS	60	0,0006 - 0,033 mg.L ⁻¹	(PIMENTEL-MORAL <i>et al.</i> , 2020)
	Etanol acidificado, por 72 horas.	ACL, ACQ e A5CS, S3OG, K3OG, Q3GECG, MCT, K3O6OG, PB e MEC.	HPLC-DAD-ESI-TOF-MS	35	-	(BORRÁS-LINARES <i>et al.</i> , 2015)

Legenda: Ácidos: ACFN= cafeoilquínico; A3C= 3-cafeoilquínico; A25DHB= 2,5-di-hidroxibenzóico; A2OTCHC= 2-o-*trans*-cafeoil-hidroxicítrico; A34DC= 3,4-dicafeoilquínico; A3HB= 3-hidroxibenzóico; A3HF= 3-hidroxifenilacético; A3M4HF = 3-metoxi-4-hidroxifenilacético; A45DC = 4,5-dicafeoilquínico; A4C = 4-cafeoilquínico; A4HB = 4-hidroxibenzóico; A4HF = 4-hidroxifenilacético; A4OC = 4 - O -cafeoilquínico; A5C = 5-cafeoilquínico; A5CS = 5-o-cafeoilshiquímico; ACF = caftárico; ACH = chiquímico; AB = benzóico; AC = cafeico; ACL = clorogênico; ACM = cumárico; ACMN = cumaroilquínico; ACQ = cumaroilquínico; ACS = cafeoilshiquímico; ACSII = cafeoilshiquímico ii; ADF4OG = dihidroferúlico- 4-o-glicuronídeo; AE = elágico; AF = ferúlico; AFQN = feruloilquínico; AG = gálico; AHC = hidroxicítrico; ANC = neocclorogênico; AP = protocatecuico; APC = *p*-cumárico; AQ = quínico; AS = sinrínico; ASA = salicílico; ASN = sinápico; CND = cianidina; QRC = quercetina; KMP = Kaempferol; miricetina = MCT; rutina = RUT; 3M4HFP = 3-metoxi-4-hidroxifenilpropionídeo; C3G = cianidina-3-glicosídeo; C3S = cianidina 3-sambubiósido; D3G = delfinidina-3-glicosídeo; D3S = delfinidina 3-sambubiósido; DHA = 3-desoxi-D-lixo-heptulosárico; EC = epigalocatequina; ECG = etilclorogenato; ECGII = etilclorogenato ii; ECGIII = etilclorogenato iii; EDAH = éster dimetilíco de ácido de hibisco; HAH = Hidroxietiléster de ácido de hibisco; K3G = kaempferol-3-glicosídeo; K3O6OG = kaempferol 3-o-(6"-o- acetil)glicosídeo; K3OG = kaempferol 3 - O -glicosídeo; K3PC = kaempferol-3- p – cumaroilglicosídeo; K3R = kaempferol 3-o-rutinoside; M3A = miricetina 3- arabinogalactosídeo; M3S = miricetina 3-sambubiósido; MC = metil-clorogenato; MDCM = metil digalato clorogenato de metila; MEC = metil-epigalocatequina; MG = metilgalato; PB = prodelfinidina b3; Q3GECG = quercetina-3-glicosídeo etilclorogenato; Q3OG = quercetina-3-o-galactosídeo; Q3R = quercetina 3-rutinosídeo; Q3S = quercetina 3-sambubiósido; QS = quercetina sambubiosídeo e; S3OG = seringetina-3-o-glicosídeo.

Tabela 1 Estudos que avaliam o teor de compostos bioativos em *Hibiscus sabdariffa* L.(continuação)

Parte da planta	Extração	Compostos fenólicos	Técnica de análise	Tempo de corrida (min)	LD e LQ	Referência
Folhas	Metanol a 50°C, por 3 horas.	CT, G(-)E, AE, AF e QRC.	HPLC – DAD GS-MS	25	0,7 – 16,5 mg/mL	(CHEN <i>et al.</i> , 2013)
	Água a 95°C, por 2 horas.	CT e AE.	HPLC-DAD	25	4,25 – 28,2 mg/mL	(LIN <i>et al.</i> , 2012)
	Água, metanol, etanol e acetona 18°C.	A3C, A3PC, A5C, A4C, A5CS, A5P5, D3S, C3S, M3S, Q3S, Q3R, Q3G e K3R.	HPLC- DAD-ESI-MS/MS	60	-	(SIM; JESS ONG; NYAM, 2019)
	Água, metanol, ácido acético/ ultrassom 10 min.	ANC, AC, RUT, KMP, KG, KGR, ACCL, QRC e ACS	HPLC-MS/ DAD	50	0,35 - 1,82 mg/g	(ZHEN <i>et al.</i> , 2016)
Flores	Etanol e água a 25°C, por 1 hora.	A3OC, A5HF24C, A5OC, MPS, QPS, Q3OR, Q3OGD, K3R, D3OS, D3OG e C3OS.	HPLC-DAD-ESI/MS	40	1,031– 7,03 mg/g	(JABEUR <i>et al.</i> , 2017)

Legenda: Ácidos: A3C = 3-cafeoilquínico; A3OC = 3-o-ácido cafeoilquínico; A3PC = 3-*p*-cumaroilquínico; A4C = 4-cafeoilquínico; A5C = 5-cafeoilquínico; A5CS = 5-o-cafeoilshiquímico; A5HF24C = 5-(hidroximetil)furfural 2,4-o-ácido cafeoilquínico; A5PC = 5-*p*-cumaroilquínico; ACS = cafeoilshiquímico; AE = elágico; AF = ferúlico; ANC = neoclorogênico; ACCL = criptoclorogênico; CT = catequina; QRC = quercetina; KMP = Kaempferol; rutina = RUT; C3OS = cianidina-3-o-sambubiósido; C3S = cianidina 3-sambubiósido; D3OG = delfinidina-3-o-glicosídeo; D3OS = delfinidina -3-o- sambubiósido; D3S = delfinidina 3-sambubiósido; K3R = kaempferol 3-o-rutinosídeo; M3S = miricetina 3-sambubiósido; MPS = miricetina-pentosilhexosídeo; Q3G = quercetina 3-glicosídeo; Q3OGD = quercetina-3-o-glicosídeo; Q3OR = quercetina-3- o – rutinosídeo; Q3R = quercetina 3-rutinosídeo; Q3S = quercetina 3-sambubiósido; QPS = quercetina-pentosilhexosídeo; KG = kaempferol-G e; KGR = kaempferol-G-Rhe.

3.6 Encapsulamento, desintegração e dissolução

Técnicas de encapsulamento como, emulsificação, gelificação inotrópica e gelificação térmica (MARTÍN *et al.*, 2017) estão sendo utilizadas para aprisionamento de substância ativa em uma matriz polimérica, com intuito de evitar interações do composto com o meio externo ou outros componentes, controlar sua liberação em matrizes alimentícias ou no organismo de consumidores (FAVARO-TRINDADE; PINHO, 2008; MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022). Esses processos são realizados para microencapsulação de insumos ativos ou não, sendo possível empacotar materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas pequenas, utilizando aparatos que atuam como uma película de proteção e impossibilitam a exposição do material encapsulado e por meio de resposta a um estímulo, em condições específicas o material pode ser liberado de forma controlada, por meio da dissolução da membrana que o reveste (FAVARO-TRINDADE; PINHO, 2008; SILVA *et al.*, 2014; CHU; CHEW; NYAM, 2021; MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022).

Os estágios no processo de encapsulamento envolvem a formação do material parede, testes para garantia de não vazamento e para assegurar que não tenha-se a presença de materiais indesejáveis em contato com o material ativo (MARTÍN *et al.*, 2017). Esse processo vem sendo aplicado em diversas áreas da indústria farmacêutica, agrícola, médica e alimentícia, possibilitando a adição de aromas, vitaminas, minerais, microorganismos probióticos, peptídeos bioativos e outras classes de compostos bioativos em alimentos, e até mesmo com o intuito de mascarar os sabores e odores desagradáveis, além de facilitar o manuseio e transporte desses materiais (FAVARO-TRINDADE; PINHO, 2008; MARTÍN *et al.*, 2017; BARROSO *et al.*, 2021; MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022). Dessa forma, entende-se que um sistema de encapsulamento de compostos bioativos deve gerar produtos seguros para consumo, pouco impacto nas propriedades sensoriais do produto, alta estabilidade físico-química com proteção contra interação com o meio, a exemplo de luz, temperatura, teor de umidade e variação de pH e maximização da absorção dos compostos encapsulados após o consumo com garantia de

liberação controlada frente a um estímulo específico (MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022).

É desejável que o material ativo (núcleo), seja revestido por um material de parede que não seja reativo, que aprisione o conteúdo dentro da cápsula, proteja-o contra condições adversas e não possua sabor (FAVARO-TRINDADE; PINHO, 2008; SILVA *et al.*, 2014). Os principais mecanismos envolvidos na liberação do núcleo são: difusão, degradação, uso de solvente, pH, temperatura e pressão. No caso do pH, ocorrem mudanças na solubilidade do material de parede quando há alterações nos valores de pH, alguns podem resistir ao pH mais ácido que é compatível com o pH do estômago, e só serem liberados no pH mais alcalino, compatível com o pH do intestino. A temperatura influencia na liberação do núcleo, fazendo com que algumas cápsulas se expandam ou colapsem ao atingir a temperatura crítica, enquanto outras possuem o material de parede fundido, devido ao aumento de temperatura, tendo-se a liberação por fusão (SILVA *et al.*, 2014).

A tecnologia de encapsulamento possibilita que a liberação ocorra de forma controlada e em ponto específico do sistema gastrointestinal, uma vez que os princípios ativos encontram-se micro encapsulados é possível utilizá-los para obtenção de formas farmacêuticas, com o preenchimento de cápsulas pré-fabricadas (BARROSO *et al.*, 2021). Essas formas farmacêuticas são produzidas com preenchimento de invólucros poliméricos (geralmente feitos com gelatina) vazios, com o material a ser encapsulado (uma mistura de insumos ativos e inertes, ou excipientes, normalmente na forma de pó, mas que também podem ser líquidos que não dissolvam o material do invólucro), que pode passar por um processo de revestimento para modificação de suas características de desintegração após a administração (BRASIL, 2019).

A dissolução é uma das formas de liberação de um núcleo, podendo ser definida como um processo que envolve a liberação de um fármaco da sua forma farmacêutica para que o mesmo se torne disponível de ser absorvido pelo organismo (CHORILLI; *et al.*, 2010), sendo importante salientar, que a mesma só ocorre após a desintegração da cápsula, onde o invólucro que reveste o princípio

ativo é fragmentado, possibilitando que a forma farmacêutica torne-se partículas passíveis de serem dissolvidas (BRASIL, 2019). Uma típica dissolução tem como objetivo demonstrar se o produto atende ou não as exigências encontradas na monografia do medicamento, possibilitando posteriormente a quantificação de substâncias ativas dissolvidas no meio de dissolução, em condições experimentais específicas, bem como permitir a otimização das formulações quando as mesmas estão na fase de desenvolvimento (CHORILLI; *et al.*, 2010; BRASIL, 2019). Para realização do teste de dissolução, é necessário o emprego de um dissolutor, equipamento constituído por cubas, recipientes abertos, com formas cilíndricas, fabricados com material transparente e inerte, onde o processo de dissolução ocorre, este possui hastes de aço inoxidável responsáveis por rotacionar o meio de dissolução, e um motor que controla a velocidade de rotação da haste. Todas as cubas são imersas em um banho de água termostaticado também produzido em material transparente, que mantém a temperatura dentro dos limites estabelecidos para o método (BRASIL, 2019).

3.7 Espécies de hibisco relatadas em estudos de encapsulamentos de compostos bioativos

Verifica-se que na literatura o maior número de pesquisas envolvem o encapsulamento de compostos bioativos extraídos de *H. sabdariffa* (AKHTAR *et al.*, 2014; GIBIS; ZEEB; WEISS, 2014; MOURA *et al.*, 2018, 2019; NGUYEN *et al.*, 2018, 2022; GÓMEZ-ALDAPA *et al.*, 2019a; DE MOURA *et al.*, 2022) e *H. cannabinus* (CHEONG *et al.*, 2016; CHEONG; NYAM, 2016; CHEW; TAN; NYAM, 2018; CHU; CHEW; NYAM, 2021) e apenas é reportado na literatura um estudo com aprisionamento de extrato de *H. acetosella* (MAR *et al.*, 2020).

Os materiais encapsulados são extraídos a partir do óleo da semente (DHAR *et al.*, 2015; CHEW; TAN; NYAM, 2018; CHU; CHEW; NYAM, 2021), extrato de cálice (AKHTAR *et al.*, 2014; GÓMEZ-ALDAPA *et al.*, 2019b; ALARA *et al.*, 2020; PIMENTEL-MORAL *et al.*, 2020; SÁYAGO-AYERDI *et al.*, 2021; NGUYEN *et al.*,

2022), extrato de flores (GIBIS; ZEEB; WEISS, 2014) e extrato de folhas (SIM; JESS ONG; NYAM, 2019; MAR *et al.*, 2020), há poucos estudos sobre a composição de compostos bioativos após a encapsulação (MOURA *et al.*, 2018, 2019; GÓMEZ-ALDAPA *et al.*, 2019b; DE MOURA *et al.*, 2022), normalmente observam-se análises da eficiência do encapsulamento (NG *et al.*, 2013; AKHTAR *et al.*, 2014; NGUYEN *et al.*, 2018; GÓMEZ-ALDAPA *et al.*, 2019b; DE MOURA *et al.*, 2022), determinações totais de compostos bioativos (NG *et al.*, 2013; CHEW; TAN; NYAM, 2018; MOURA *et al.*, 2019; CHU; CHEW; NYAM, 2021; HAPSARI; MANIKHARDA; SETYANINGSIH, 2021; DE MOURA *et al.*, 2022; NGUYEN *et al.*, 2022), bem como atividade antioxidante (CHEW; TAN; NYAM, 2018; MOURA *et al.*, 2018, 2019; SIM; NYAM, 2021; DE MOURA *et al.*, 2022; NGUYEN *et al.*, 2022), antimicrobianas (GÓMEZ-ALDAPA *et al.*, 2019b; SIM; JESS ONG; NYAM, 2019; SIM; NYAM, 2021), bem como bioacessibilidade (CHEW; TAN; NYAM, 2018) e biodisponibilidade (MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022).

3.8 Métodos cromatográficos na análise de compostos fenólicos

Os métodos mais comuns utilizados na análise de compostos fenólicos em amostras vegetais são os cromatográficos, pois possibilitam a separação e identificação dos componentes de forma isolada, com base em espectros de padrões analíticos do composto de interesse, sendo considerada uma técnica robusta.

3.8.1 Cromatografia Líquida

A cromatografia líquida é a técnica que tem sido mais empregada para análise de compostos fenólicos em amostras de hibisco, tornando-se crescente o interesse pela separação, identificação e quantificação desses compostos (HAPSARI; MANIKHARDA; SETYANINGSIH, 2021), como é possível observar na Tabela 1, disposta nas páginas 32-33. Há um destaque para a cromatografia líquida

de alta eficiência (HPLC) e a cromatografia líquida de alta performance (UPLC). A HPLC possibilita a separação e possível identificação dos compostos fenólicos com base na comparação com espectros de um analito conhecido, entretanto, se desejar uma separação ultrarrápida com alta eficiência, pode-se empregar a UPLC, que possui tempo de análise variando entre 15 a 50 minutos com aplicação de gradiente de eluição, na determinação de fenólicos em amostras de hibisco. Vários detectores podem ser usados na cromatografia líquida, que incluem UV-Vis, arranjo de fotodiodos (DAD), detecção eletroquímica (ECD) e detecção fluorométrica (FLD) e de acordo com o objetivo de análise, para possibilitar maior seletividade e sensibilidade do método pode-se combinar a espectrofotometria de massa (MS) na identificação (HAPSARI; MANIKHARDA; SETYANINGSIH, 2021).

3.9 Quimiometria

A quimiometria consiste no emprego de modelos matemáticos e estatísticos para o planejamento de experimentos, objetivando-se a otimização da coleta de informações químicas por meio de análise multivariada e sendo utilizada juntamente com métodos e técnicas analíticas (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006). Percebe-se que o número de pesquisadores que tem aplicado a quimiometria em suas pesquisas vem sendo crescente, e suas aplicações normalmente incluem as principais áreas: planejamento e otimização de experimentos, reconhecimento de padrões (métodos de análise exploratória e classificação) e calibração multivariada, verificando-se que no Brasil, os planejamentos experimentais mais usados são os fatoriais, completos ou fracionários, e os planejamentos compostos centrais (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006; BREITKREITZ; DE SOUZA; POPPI, 2014; RAJENDRAN et al., 2022).

Quanto ao reconhecimento de padrões, estes são aplicados com finalidades distintas, e entre elas encontram-se a análise exploratória de dados, classificação de amostras e resolução de curvas. As variáveis (características dos objetos - como concentração analítica, altura dos picos cromatográficos ou absorvância) responsáveis pela descrição de objetos (como compostos, amostras, espectros ou cromatogramas) que compõem um conjunto de dados químicos, podem ter seus padrões de associações do conjunto detectados com o uso de métodos de análise exploratória de dados como Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) e Análise de Componentes Principais (PCA) (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006).

Com relação as curvas de calibração, as mesmas são construídas relacionando-se o sinal analítico com uma faixa de concentração conhecida, estabelecendo-se então as constantes proporcionais entre esses fatores, entretanto, em amostras reais podem ocorrer alguns problemas (BARROS NETO; SCARMINIO; BRUNS, 2006). A exemplo de análises espectrofotométricas quantitativas que possuem muitos componentes com espectros superpostos, podem ocorrer, portanto, interferências espectrais e desconhecimento da identidade real de compostos de interesse. Com o emprego da quimiometria na calibração multivariada tem-se a minimização de problemas eventuais com linha base ou interferentes nas amostras utilizadas na calibração e em novas amostras de previsão (FERREIRA et al., 1999).

São muitas as vantagens em utilizar as ferramentas quimiométricas, como por exemplo, a facilitação da interpretação e melhor caracterização dos dados, bem como a obtenção de informações das relações entre variáveis e amostras, além de ser possível medições diretas, diminuindo a quantidade de etapas de pré-tratamento de uma amostra e conseqüentemente, o aumento da frequência analítica.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Investigar a composição em termos de bioativos fenólicos, de cápsulas comerciais contendo *hibiscus*, por meio de dissolução, extração em fase sólida (SPE) e análise por cromatografia líquida de alta eficiência com detectores de arranjo de diodos (HPLC-DAD).

4.2 Objetivos específicos

- Analisar a influência das variáveis (volume do meio, pH do meio e volume do eluente) sobre o ensaio de dissolução e extração em fase sólida de bioativos fenólicos;
- Aplicar o planejamento experimental Box-Behnken (DBB) como metodologia de superfície de resposta e otimização do método de dissolução com extração em fase sólida dos bioativos fenólicos;
- Avaliar a utilização da extração em fase sólida (SPE) na eliminação de possíveis interferentes e aumento da sensibilidade da técnica de análise;
- Utilizar ferramentas de análise exploratória para compreensão dos dados e das similaridades apresentadas pelo conjunto, em amostras de *hibiscus* encapsulados comercializadas na cidade de Salvador-Bahia;
- Estabelecer o perfil fenólico de cápsulas de hibisco, comparando os resultados obtidos referentes a presença de bioativos fenólicos com os que são reportados na literatura para amostras *in natura* de hibisco.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Reagentes e soluções

Soluções tampão de pH 1, 2, 3, 5 e 8 foram preparadas como meios de dissolução, com os reagentes: ácido clorídrico (P.A, Synth, $\geq 38\%$ de pureza), ácido acético glacial (P.A, J.T.Baker, $\geq 99,7\%$), acetato de sódio (P.A, Synth, $99,95\%$ de pureza), cloreto de potássio (P.A, Synth, $99,95\%$ de pureza), tris-(hydroxymethyl-aminomethane) (P.A, Merck, $99,9\%$ de pureza), biftalato de potássio (P.A, Vetec, $99,95\%$ de pureza), hidróxido de sódio (P.A, Êxodo Científica, $\geq 97\%$) e água ultrapura, obtida em sistema de purificação (Ultrapurificador de água, Gehaka, Master P&D).

Para a extração em fase sólida (SPE), espumas de poliuretano Scotch-Brite™ da 3M foram tratadas com solução de ácido nítrico (P.A, A.C.S Synth, $\geq 99,90\%$ de pureza) 1 mol L^{-1} e lavadas com metanol (P.A, Synth, $99,8\%$ de pureza). Nos ensaios dos teores de fenólicos totais (TPC), foi utilizado o reagente de Folin-Ciocalteu (2M, Êxodo Científica), uma solução de carbonato de sódio anidro 20% (m/v) (P.A, Vetec, $\geq 99,5\%$ de pureza), contendo 20 g de Na_2CO_3 que foi dissolvido e avolumado em um balão volumétrico de $100,0 \text{ mL}$ com água ultrapura. Também foi preparada uma solução padrão de ácido gálico de 1000 ppm com a solubilização de $0,01 \text{ g}$ de ácido gálico ($\geq 98,0\%$ de pureza) em metanol (P.A, Synth, $99,8\%$ de pureza) e avolumada para um balão de 10 mL . Da solução padrão de ácido gálico de 1000 ppm , e foi realizada uma diluição retirando-se uma alíquota de 1 mL e avolumando-se com metanol em um balão volumétrico de $10,0 \text{ mL}$, obtendo-se uma solução de 10 ppm .

Neste estudo foi utilizado um cromatógrafo líquido de alta eficiência HPLC (Shimadzu, LCsolutions, modelo DGU-20A5 Prominence, Japão), equipado com detectores de arranjo de diodos (Shimadzu, modelo SPD-M20A Prominence, Japão). A separação cromatográfica foi realizada com uma coluna Lichrospher®

RP-18 (5 μm), (250 x 4,0 mm) Sigma-Aldrich (EUA), 42°C de temperatura do forno e uma mistura de solventes (metanol e solução aquosa de ácido acético a 1% v/v), como fase móvel em gradiente de eluição e de vazão descritos na Tabela 2. Para a análise cromatográfica, os seguintes reagentes e soluções foram utilizados: metanol (grau HPLC, Vetec, 99,9%), ácido acético glacial (grau HPLC, Neon, \geq 99,8% de pureza), na concentração de 1,0% (v/v), todas as soluções e extratos injetados no HPLC foram filtrados com disco de filtro seringa de 0,45 μm / 47 μm (MF-Millipore).

Tabela 2 Gradiente de eluição e vazão

Tempo (min)	HAc 1% (v/v)	Metanol (HPLC)	Vazão (mL min⁻¹)
0	100	0	0,8
10	80	20	0,8
12	80	20	0,8
23	60	40	0,8
24,5	60	40	1,0
36	40	60	1,0
37	40	60	1,2
39	30	70	1,3
39,5	100	0	1,3
42	100	0	0,8
43	100	0	0,8

Fonte: (MAGALHÃES, 2022)

Utilizado como constituinte da fase móvel, a solução de ácido acético 1% (v/v) foi preparada com a adição de 10,0 mL de ácido acético em um balão volumétrico de 1000,00 mL, aferindo-se com água ultrapura obtida em sistema de purificação (Ultrapurificador de água, Gehaka, Master P&D), a solução foi filtrada a vácuo, e posteriormente sonicada por 30 minutos. Todos os padrões analíticos

utilizados de ácido gálico ($\geq 98,0\%$ de pureza), ácido clorogênico ($\geq 95,0\%$ de pureza), ácido cafeico ($\geq 98,0\%$ de pureza), ácido *p*-cumárico ($\geq 98,0\%$ de pureza), ácido ferúlico ($\geq 99,0\%$ de pureza), ácido *trans*-cinâmico ($\geq 97,0\%$ de pureza), ácido protocatecuico ($\geq 98,0\%$ de pureza), ácido sinrínico ($\geq 98,0\%$ de pureza), ácido elágico ($\geq 98,0\%$ de pureza), vanilina, catequina ($\geq 98,0\%$ de pureza), rutina ($\geq 98,0\%$ de pureza), naringenina ($\geq 98,0\%$ de pureza), Kaempferol ($\geq 98,0\%$ de pureza), foram de procedência da Sigma-Aldrich.

Soluções estoque dos compostos fenólicos foram preparadas na concentração de $1,0 \text{ g L}^{-1}$, com $0,01 \text{ g}$ de cada composto transferido para um balão volumétrico de $10,0 \text{ mL}$, completando o volume final com metanol. Já para o preparo das soluções intermediárias de $100,0 \text{ mg L}^{-1}$, pela diluição de $1,0 \text{ mL}$ de cada solução estoque em um balão de $10,0 \text{ mL}$, completando o volume final com metanol e para o preparo da mistura intermediária de $10,0 \text{ mg L}^{-1}$, foi preparada pela diluição de $1,0 \text{ mL}$ de cada solução intermediária em um balão de $10,0 \text{ mL}$, completando o volume final com metanol. Dessas soluções, uma alíquota de $1,0 \text{ mL}$ foi retirada do padrão de 10 ppm , para o preparo do mix com os 13 compostos fenólicos, avolumando com metanol em um balão volumétrico de $25,0 \text{ mL}$.

Os compostos bioativos identificados e determinados pelo método de separação cromatográfica desenvolvido por Magalhães (2022), encontram-se listados na Tabela 3, com seus respectivos valores de comprimento de onda de máxima absorção e tempos de retenção.

Tabela 3 Analitos com seus respectivos tempos de retenção e comprimento de onda

Analito	Comprimento de onda (nm)	Tempo de retenção do padrão (min)
Ácido gálico	272	7,01
Ácido protocatecuico	260	10,30
Catequina	280	13,51
Ácido clorogênico	330	15,48
Ácido cafeico	330	16,42
Ácido sinríntrico	272	17,95
Vanilina	280	18,95
Ácido <i>p</i>-cumárico	310	20,19
Ácido ferúlico	330	21,85
Ácido sinápico	330	22,44
Rutina	360	25,35
Ácido elágico	260	26,33
Ácido <i>trans</i>- cinâmico	280	29,63
Naringenina	280	30,35
Quercetina	360	30,84
Kaempferol	360	34,13
Crisina	272	39,83

Fonte: (MAGALHÃES, 2022)

5.2 Ensaios de desintegração

Os ensaios de desintegração foram realizados no desintegrador de comprimidos Nova Ética, com controle de tempo e temperatura e circulação livre de água de modo a garantir homogeneidade da temperatura da água. A condição ajustada de temperatura foi de $37^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ (BRASIL, 2019) até que o equilíbrio térmico da água do banho em acrílico incolor, fosse atingido, realizou-se o ensaio de desintegração em triplicata, cada cesta com espaço para seis cápsulas e com o cronômetro para verificação dos tempos de desintegração. A Figura 7 ilustra o processo de desintegração da cápsula de hibisco no desintegrador, este aparelho possui movimentos para cima e para baixo, com frequência constante, simulando o movimento do organismo humano.

Figura 7 Processo de desintegração da cápsula de hibisco

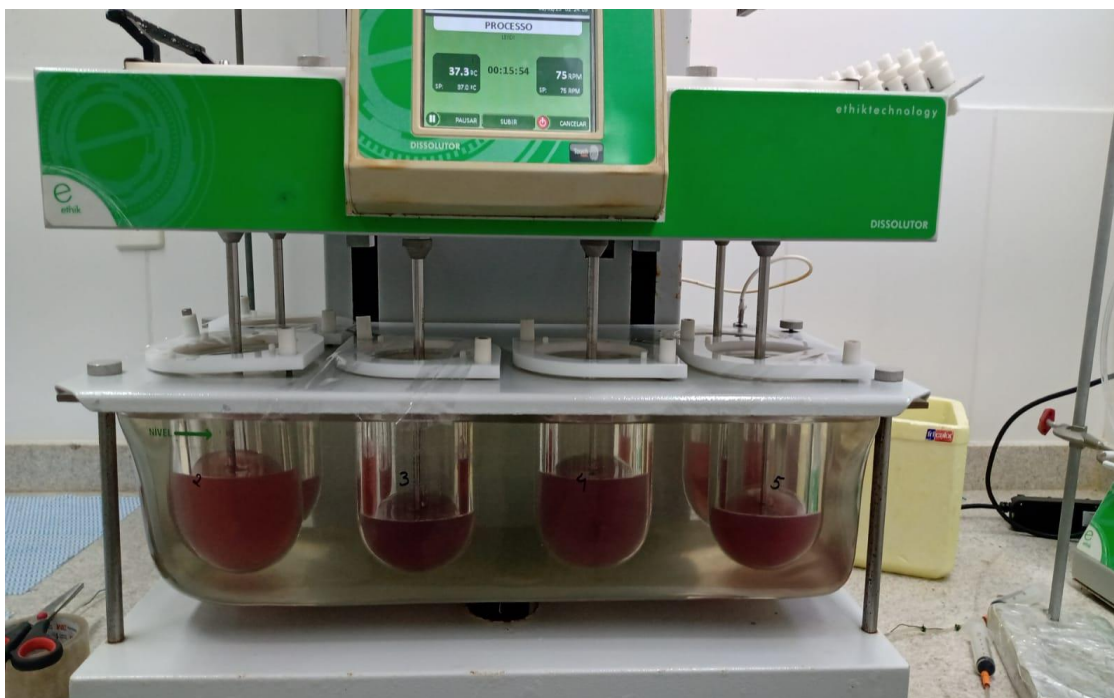


Fonte: De autoria própria.

5.3 Teste e perfil de dissolução

Os ensaios de dissolução foram realizados em um aparelho dissolutor, conforme a Figura 8, que consiste em um banho de água para aquecimento e regulação da temperatura, com circulação constante, plataforma móvel e hastes de material inerte, pás, agitador com regulação na velocidade de rotação, termostato e cubas. Após a colocação das soluções de dissolução nas cubas, foi aguardado e monitorado o tempo até que a temperatura da solução e do banho estivesse em $37 \text{ }^\circ\text{C} \pm 0,5 \text{ }^\circ\text{C}$ (BRASIL, 2019).

Figura 8 Dissolução das cápsulas de hibisco



Fonte: De autoria própria.

As condições estabelecidas para o meio de dissolução foi: soluções tampão com valores iniciais de pH de 2, 5 e 8; tempo do ensaio de 30 minutos; e rotação

de 75 rpm. Perfis de dissolução também foram realizados considerando as condições de rotação e temperatura mencionadas acima, condições otimizadas de dissolução (volume do meio = 333 mL e pH do meio = 2) e o tempo de 60 minutos, retirando-se alíquotas de do meio de 10,0 mL do meio de dissolução e repondo em quantidade igual logo em seguida, considerando-se os intervalos de tempos de 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 45 e 60 min.

5.4 Teste de uniformidade de doses unitárias

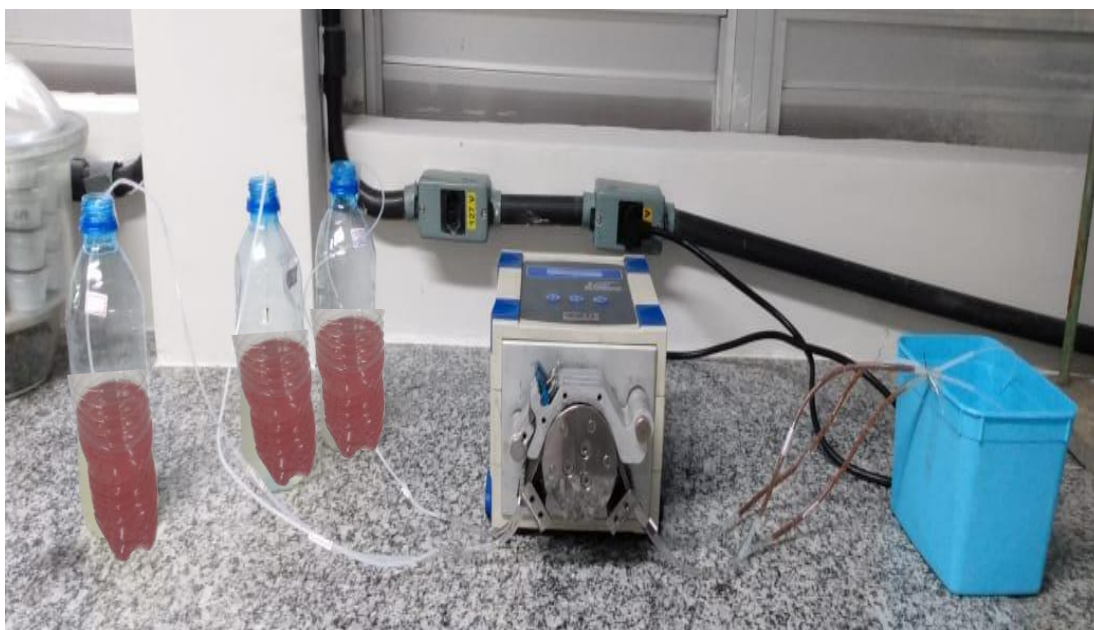
O peso médio é um teste realizado para verificar se as unidades de um mesmo lote apresentam uniformidade de peso e para isso foi realizado a pesagem de 20 cápsulas individualmente com o seu conteúdo, depois disso elas foram abertas para remoção do conteúdo, com auxílio de um pincel e posteriormente foram pesadas novamente vazias, assim como preconiza a Farmacopeia brasileira (BRASIL, 2019). Os limites de variação estabelecidos para cápsulas duras e moles que pesam mais de 300 mg é de $\pm 7,5\%$ (BRASIL, 2019).

5.5 Extração em Fase sólida (SPE)

Como sorvente na extração em fase sólida foi utilizada espuma de PU, foram adquiridas esponjas da marca Scotch-Brite™ da 3M, e a parte amarela foi triturada com água, posteriormente adicionada a metanol P.A por 24 horas, para remoção de possíveis contaminantes orgânicos. Seguida dessa primeira parte, a espuma foi retirada do banho de metanol e colocada para secagem em temperatura ambiente. Após isso, foram preparados cartuchos em tubos Tygon® para transporte das soluções uma mini-coluna (2,794 mm de diâmetro interno, 4.470 mm de diâmetro externo) contendo espumas de PU como sorvente, com massa de 0,5 g, para realização de pré-concentração dos analitos presentes no dissolvido. A extração foi realizada utilizando uma bomba peristáltica de quatro canais modelo LDP 105-6 (Tecnopon, Piracicaba, SP, Brasil) que induzia a passagem do dissolvido pela

coluna preparada com espuma de PU, numa vazão de 1 mL por minuto, o esquema de extração em fase sólida encontra-se na Figura 9. Após a passagem dos volumes de dissolvidos, conforme o planejamento indicado na Tabela 6 (página 57), foi bombeado a passagem de eluente (1% v/v de ácido acético) para dessorção dos analitos e o volume coletado em micro tubos.

Figura 9 Processo de extração em fase sólida



Fonte: De autoria própria.

5.6 Otimização multivariada

Nos processos químicos é comum que as variáveis tenham relação entre si, de tal forma, o planejamento fatorial 2^k permite avaliar de forma simultânea os efeitos das variáveis sobre um processo, utilizando dois níveis (inferior e superior) e k fatores, sem a necessidade de realizar uma grande quantidade de ensaios experimentais, reduzindo assim o consumo de reagentes, tempo na análise e inserção de erros experimentais.

5.6.1 Planejamento de dois níveis completo 2^3

O planejamento fatorial completo com dois níveis foi realizado para investigação da influência estatística das variáveis volume do meio, pH do meio e volume do eluente, bem como os efeitos de interação entre as repostas sobre os ensaios de dissolução. A matriz de planejamento utilizada perfazendo um total de 11 experimentos, incluindo o ponto central em triplicata para estimativa do erro experimental, não necessitando da repetição de triplicatas de todos os experimentos. Os níveis codificados foram inferior (-), central (0) e superior (+), obtendo-se as seguintes condições: volume do meio 250 mL, 500 mL e 750 mL; pH do meio 2, 5 e 8; e para o volume de eluente 1 mL, 3 mL e 5 mL.

Para cada ensaio experimental foi calculada a resposta múltipla (RM), como respostas analíticas, para cada analito buscou-se verificar em qual ensaio era apresentado uma maior área de pico cromatográfico, esse maior valor de resposta, dividia individualmente todos os outros valores de respostas analíticas para o mesmo analito, fazendo-se uma normalização. Feito isso, os valores normalizados para cada ensaio experimental foram somados, obtendo-se assim a resposta múltipla de cada experimento. A Equação 1, demonstra esse processo, em que A_i é a área do pico cromatográfico obtido para um analito e $A_{i\max}$ corresponde a maior área do pico cromatográfico para um mesmo analito em todos os experimentos.

$$RM = \sum\left(\frac{A_i}{A_{i\max}}\right) \quad (1)$$

5.6.2 Planejamento Box-Behnken

A metodologia de superfície de resposta (RSM) engloba um conjunto de métodos matemáticos e estatísticos para definição das relações entre a resposta e as variáveis independentes, onde é possível otimizar um processo e gerar um

modelo matemático. Dentre essas metodologias encontra-se o planejamento experimental Box-Behnken que tem como objetivo a otimização de um processo e quando aplicada para avaliação de três fatores, sendo necessária a utilização de 12 ensaios que é dada pela Equação 2 e uma triplicata do ponto central, com cada fator sendo estudado em três níveis.

$$\text{Quantidade de ensaios} = 2k(k - 1) + C_0 \quad (2)$$

Na equação, o termo k corresponde a quantidade de fatores e C_0 a quantidade de réplicas do ponto central. A equação do modelo matemático é geralmente definida com a utilização de uma regressão polinomial de baixo grau em alguma região das variáveis independentes, a exemplo do modelo de regressão polinomial de segunda ordem demonstrado na Equação 3.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_{ii}^2 + \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j>i}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (3)$$

Onde β_0 , β_i , β_{ii} e β_{ij} são os coeficientes do polinômio de regressão, linear, os coeficientes quadráticos e de interação, respectivamente, e x_i e x_j são as variáveis independentes, já o ε corresponde ao termo de erro (GONZALEZ; MACHADO; TOMAZI, 2020).

Um domínio experimental com as condições ajustadas para o novo planejamento (Tabela 4) Box-Behnken, foi adotado, o mesmo conta com as três variáveis (volume do meio, pH do meio e volume do eluente) variando em três níveis, perfazendo um total de 15 ensaios experimentais incluindo três pontos centrais, conforme a Tabela 7 (página 60), com intuito de obter as condições ótimas experimentais.

Em cada experimento a resposta múltipla foi calculada, considerando o analito do ensaio que era apresentado uma maior resposta analítica, esse maior valor de resposta, dividia individualmente todos os outros valores de respostas analíticas do mesmo analito. Feito isso, os valores normalizados para cada ensaio

experimental foram somados, obtendo-se assim a resposta múltipla de cada experimento, conforme Equação 1.

Tabela 4 Fatores e níveis empregados no planejamento Box-Behnken

Fatores	Níveis		
	- (inferior)	0 (central)	+ (superior)
Volume do Meio (mL)	250	375	500
pH do meio	1	3	5
Volume do Eluente (mL)	1	2	3

Fonte: De autoria própria.

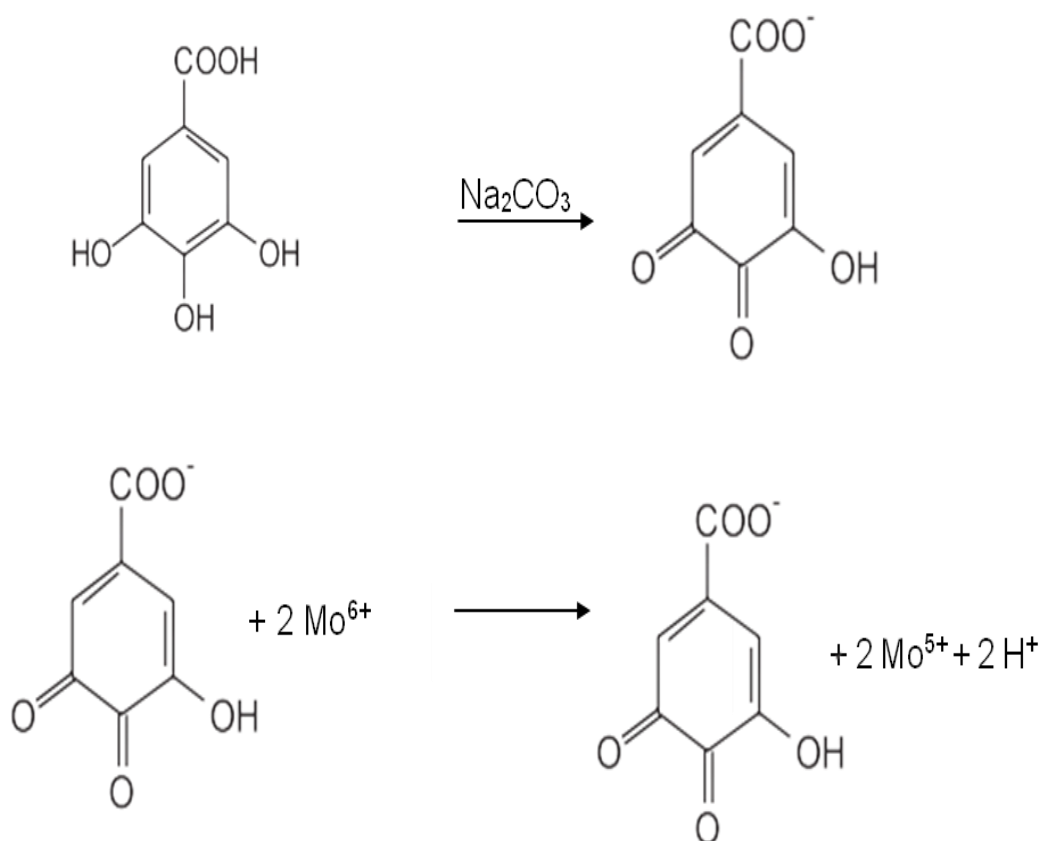
5.6.3 Fenólicos totais

Seguindo o método de Magalhães (2022), utilizou-se soluções de carbonato de sódio 20% (m/v), ácido gálico de 100 ppm e o reagente *Folin-Ciocalteu*. No primeiro momento preparou-se seis padrões para construção da curva, todos em triplicata e com concentrações variando de 0 a 5 ppm. Para o teste de fenólicos totais tomou-se alíquotas dos ensaios 1, 2, 3, 4 e 9 indicados na Tabela 6, todos em triplicata e adicionou-se 200 µL do reagente *Folin-Ciocalteu* e 600 µL da solução de carbonato 20 % (m/v), agitou-se e tampou após 2 horas em local escuro, foi feita a leitura dos valores de absorvâncias utilizando um espectrofotômetro Biospectro, modelo SP-22, faixa de 200-1000nm (monofeixe), banda de passagem de 5nm (fixa), com suporte para 4 cubetas de 10mm, no comprimento de onda de 765 nm.

Na Figura 10 é possível observar a reação que acontece entre o reagente Folin-Ciocalteu e o ácido gálico, ela se inicia em meio básico para que ocorra a desprotonação do ácido gálico, dando origem a íons fenolatos. O Folin-Ciocalteu possui na sua composição uma mistura de ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico, e a sua cor amarelada é atribuída ao complexo $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, onde o molibdênio

apresenta estado de oxidação (VI) e quando este entra em contato com espécies redutoras, a exemplo do ácido gálico na sua forma desprotonada, forma complexos molibdênio-tungstênio azuis [(PMoW₁₁O₄)₄⁻], em que a média do valores de oxidação dos metais está entre (V) e (VI), promovendo a mudança de coloração da cor amarelada do reagente para a coloração azulada devido a formação deste último complexo.

Figura 10 Reação do ácido gálico com molibdênio presente no reagente de Folin-Ciocalteu



Fonte: Adaptado de (OLIVEIRA *et al.*, 2009)

5.6.4 Avaliação da eficiência de separação cromatográfica

A cromatografia é uma técnica de separação, em que os componentes de uma amostra são divididos entre uma fase estacionária e uma fase móvel, dessa forma a avaliação de alguns parâmetros e fatores indica se os analitos estão sendo separados de forma eficiente. A resolução (R_s) é um dos parâmetros de avaliação da eficiência em uma separação cromatográfica, sendo medida como a distância entre picos adjacentes, é avaliada por três fatores, e é, portanto, calculada por meio da Equação 4.

$$R_s = \frac{2\Delta t}{w_1 + w_2} \quad (4)$$

Em que Δt é a medida da separação dos máximos de dois picos adjacentes e W_1 e W_2 são as larguras das bases dos picos. Os fatores que influenciam a resolução são N (número de pratos teóricos), k (fator de retenção) e α (seletividade) (LANÇAS, 2016), calculados por meio das equações 5, 6 e 7, presentes a seguir:

$$N = 16 \left(\frac{t_r}{W_b} \right)^2 \quad (5)$$

$$K = \frac{t_r}{t_0} \quad (6)$$

$$\alpha = \frac{tr_2}{tr_1} \quad (7)$$

Onde, o termo t_r refere-se ao tempo de retenção ajustado, t_0 ao tempo morto, tempo de retenção da fase móvel na coluna e W_b corresponde a largura da base do pico, informações obtidas a partir de um cromatograma. Espera-se que o fator de retenção (k) tenha valores situando-se entre 0,5 e 20, para análises múltiplas, já o número de pratos teóricos (N) juntamente com a seletividade (α), são parâmetros que normalmente avaliam o desempenho da coluna, sendo desejável que os valores sejam maiores que 2000 para N , e maior que 1 para o α .

5.6.5 Amostragem

Com os parâmetros de dissolução otimizados foi realizado uma análise em seis amostras de hibisco em cápsulas, comercializadas em pontos distintos de Salvador-Bahia, os códigos adotados, ingredientes presentes e composição do material de parede, encontram-se listados na Tabela 5.

Tabela 5 Códigos e descrição de cápsulas de hibisco

Cápsulas	Ingredientes	Composição da cápsula
FITPI	Hibisco extrato aquoso desidratado emp ó (maltodextrina, hibisco extrato aquoso), maldoextrina e antiulectante talco.	Gelatina e umectante glicerina.
FITPII	Hibisco extrato aquoso desidratado emp ó (maltodextrina, hibisco extrato aquoso), maldoextrina e antiulectante talco.	
SMNUT	Hibisco sabdariffa (flor) em pó.	
MTCMT	Folha de hibisco.	Gelatina.
HIBMIX	-	-
CMBFIT	Hibisco em pó, amido, talco e dióxido de silício.	Gelatina, corantes: dióxido de titânio, Vermelho ácido, azul brilhante.

Fonte: De autoria própria.

5.7 Análise exploratória de dados

A quimiometria é muito utilizada na química analítica e engloba a matemática e a estatística para criação de hipóteses e informações químicas complementares em uma análise com a utilização softwares que realizam o processamento dos dados, combinando as variáveis e analisando-as em várias dimensões. É possível empregar esses métodos estatísticos e extrair informações correlacionadas entre

muitas variáveis, o que não é possível em uma análise univariada. Para análise de amostras de cápsulas de hibisco, foram realizadas HCAs, com geração de um dendrograma para visualizar a similaridade dos dados das amostras e os gráficos de autovalores, utilizando-se os valores das áreas dos analitos após análise no HPLC-DAD, a fim de se obter informações sobre os PCAs e sua influência sobre os dados.

5.7.1 Análise de Agrupamentos Hierárquicos - HCA

Por meio HCA, tem-se como objetivo agrupar objetos com base em suas semelhanças internas, deixando os que não são semelhantes em grupos distintos. Obtém-se, portanto, um dendrograma, gráfico que indica os graus de similaridade entre objetos, e organiza os dados em um esquema bidimensional. É feito um cálculo da distância entre todas as amostras do conjunto, definindo-se uma matriz de similaridade, onde os elementos da matriz são chamados de índices de similaridade, variando de zero a um e indicando que quanto maior for o valor do índice, menor é a distância entre os grupamentos e maior à similaridade entre eles.

5.7.2 Análise de Componentes principais - PCA

O uso de outras técnicas quimiométricas para analisar as respostas de uma análise, tais como PCA possibilita a identificação da origem da variabilidade dos resultados que causam a não conformidade. A PCA correlaciona variáveis transformando-as linearmente em um menor número de variáveis, com o objetivo de encontrar um subespaço do espaço das variáveis onde os dados mais variam, ou seja, há uma diminuição na dimensionalidade dos dados, aumentando a possibilidade de interpretação deles, sem a perda de informações originais.

5.8 Softwares utilizados no tratamento dos dados

Os programas Statistica® versão 7 e Microsoft Excel® foram usados no tratamento de dados, que foram submetidos à análise de variância unidirecional (ANOVA) e testes de comparação múltipla de Tukey usando planilha disponibilizada pelo Centro de Ciências Agrárias da UFSCar. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas no nível $p < 0,05$, com intervalo de confiança de 95%.

6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

6.1 Otimização do método de dissolução

Os resultados obtidos no planejamento fatorial completo 2^3 encontram-se expressos na Tabela 6, empregando a Equação 1 as respostas múltiplas das áreas dos analitos foram calculadas e utilizando-as foi possível confeccionar o gráfico de Pareto (Figura 8), e analisar o comportamento dos fatores (pH do meio, volume do meio de dissolução e volume do eluente), verificando a possibilidade de otimização deles.

Tabela 6 Matriz do planejamento fatorial de dois níveis completo

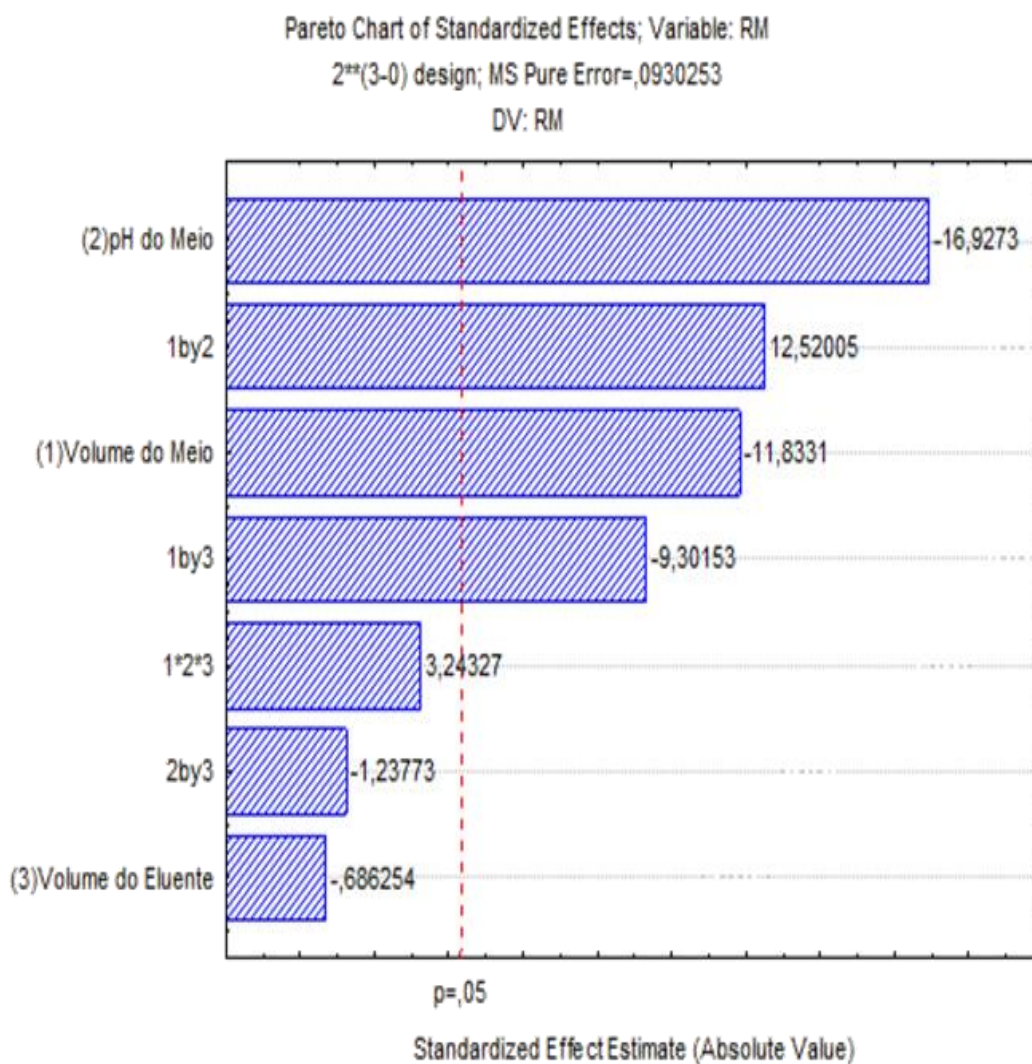
Ensaio	Volume do Meio (mL)	pH	Volume do Eluente (mL)	Resposta Múltipla (RM)
1	- (250)	- (2)	- (1)	7,34
2	+ (750)	- (2)	- (1)	4,79
3	- (250)	+ (8)	- (1)	1,95
4	+ (750)	+ (8)	- (1)	3,41
5	- (250)	- (2)	+ (5)	10,16
6	+ (750)	- (2)	+ (5)	2,20
7	- (250)	+ (8)	+ (5)	2,84
8	+ (750)	+ (8)	+ (5)	1,69
9	0 (500)	0 (5)	0 (3)	2,35
10	0 (500)	0 (5)	0 (3)	2,64
11	0 (500)	0 (5)	0 (3)	2,96

Fonte: De autoria própria.

Analisando o gráfico de pareto (Figura 10), observou-se que o volume do meio se mostrou como uma variável significativa, com efeito negativo, ou seja, em menores volumes têm-se uma resposta analítica melhor, possivelmente em virtude do aumento da concentração dos analitos. O pH do meio também foi uma variável

com significância e efeito negativo, indicando que em menores valores é possível obter um melhor sinal analítico, pois em baixos valores de pH os compostos fenólicos tendem a estar na sua forma protonada, já o volume do eluente não se apresentou como variável significativa. Foi possível observar também que as interações entre volume do meio e pH do meio, bem como volume do meio e volume do eluente demonstraram significância, sendo a primeira com correlação positiva, indicando o aumento de uma quando a outra aumenta, e a segunda apresenta correlação negativa, ou seja, há uma tendência da diminuição de uma variável quando a outra diminui.

Figura 11 Gráfico de Pareto do planejamento fatorial 2^3



Fonte: Dados da pesquisa.

Optou-se por elaborar um novo domínio (Tabela 8) para otimização dos parâmetros de dissolução com as condições de 250 mL, 375 mL e 500 mL, para o volume do meio e com os valores de 1, 3 e 5 para o pH do meio; esses valores estão relacionados aos níveis inferior, central e superior, respectivamente. Como o volume do eluente não se demonstrou uma variável de efeito significativo, conforme análise do gráfico de pareto (Figura 13), o novo domínio projetado manteve as

condições iniciais para esse fator, conforme o planejamento fatorial 2^3 , que constam na Tabela 6.

O planejamento experimental escolhido para Metodologia de Superfície de Resposta (RMS) e otimização das condições ótimas empregues na dissolução foi o Box-Behnken (DBB), a matriz está descrita na Tabela 7. Uma RMS pode ser utilizada quando se deseja maximizar ou minimizar uma resposta, e nesse caso específico que se tem três fatores (volume do meio, pH e volume do eluente) para avaliação, é mais vantajoso a sua utilização por possibilitar a realização de uma menor quantidade de experimentos, em relação a outros modelos estatísticos, sendo um total de 15 experimentos, já incluindo 3 pontos centrais. Esse planejamento é indicado para avaliar os níveis baixo, central e alto dos fatores, fixando uma variável em zero e executando um fatorial 2^2 nas outras duas variáveis, sendo utilizado para investigar as possíveis interações entre as variáveis experimentais.

Após a realização dos ensaios de dissolução considerando o planejamento experimental DBB, foi possível calcular as respostas múltiplas das áreas dos analitos por meio da Equação 1 e os dados obtidos encontram-se descritos na Tabela 7. Com esses resultados foi possível então obter gráficos (Figura 13) da superfície de resposta com as interações entre as variáveis. Pode-se observar que nos ensaios experimentais destacados em negrito (2, 6 e 13) foram obtidos os maiores valores de resposta múltipla, inferindo-se que quanto menor for os valores de pH, melhores são as condições de respostas obtidas. Tal fato é compreensível, visto que em baixos valores de pH os analitos presentes demonstram-se mais disponíveis no meio de dissolução, conseqüentemente há um aumento na resposta analítica em relação aos mesmos, principalmente quando há uma redução no volume do meio. Alguns trabalhos descreveram que condições ácidas de extração favorecem a extração devido a estabilização de alguns compostos como antocianinas (LIN *et al.*, 2012; CASSOL; RODRIGUES, 2019; ESCOBAR-ORTIZ *et al.*, 2021; NGUYEN *et al.*, 2022).

Tabela 7 Matriz do planejamento experimental Box-Behnken

Ensaio	Volume de Meio	pH	Volume de Eluente	Resposta Múltipla (RM)
1	- (250)	- (1)	0 (2)	6,39
2	+ (500)	- (1)	0 (2)	5,55
3	- (250)	+ (5)	0 (2)	3,00
4	+ (500)	+ (5)	0 (2)	2,60
5	- (250)	0 (3)	- (1)	4,70
6	+ (500)	0 (3)	- (1)	5,36
7	- (250)	0 (3)	+ (3)	4,33
8	+ (500)	0 (3)	+ (3)	3,54
9	0 (375)	- (1)	- (1)	3,39
10	0 (375)	+ (5)	- (1)	3,07
11	0 (375)	- (1)	+ (3)	3,78
12	0 (375)	+ (5)	+ (3)	3,02
13	0 (375)	0 (3)	0 (2)	5,36
14	0 (375)	0 (3)	0 (2)	4,58
15	0 (375)	0 (3)	0 (2)	4,94

Fonte: Dados da pesquisa.

6.2 Teor de fenólicos totais das amostras de hibisco

O teor de fenólicos totais (TPC) foi determinado com base no ensaio do reagente Folin-Ciocalteu, um método colorimétrico baseado em reações de transferência de elétrons entre o Folin e os compostos fenólicos presentes na

amostra. Para isso, foi construída uma curva de calibração com concentrações conhecidas de ácido gálico relacionando a concentração e o sinal analítico obtido, a absorvância, gerando a e a equação de reta (Equação 8).

$$y = 0,1006x - 0,0077 \quad (8)$$

O coeficiente de determinação foi de $R^2 = 0,9988$ e essa equação foi utilizada para calcular os valores de concentração fenólicos totais encontrados nos ensaios experimentais, conforme a Tabela 8.

Tabela 8 Teor de Fenólicos Totais

Ensaio	Volume do Meio (mL)	pH do meio	Absorbância ($\lambda = 765$ nm)	TPC (mg/100g)
1	- (250)	(2)	0,078	8518,89
2	+ (750)	(2)	0,027	10347,91
3	- (250)	(8)	0,078	8518,89
4	+ (750)	(8)	0,032	11838,96
9	0 (500)	(5)	0,049	11272,36
10	0 (500)	(5)	0,050	11471,17
11	0 (500)	(5)	0,046	10675,94

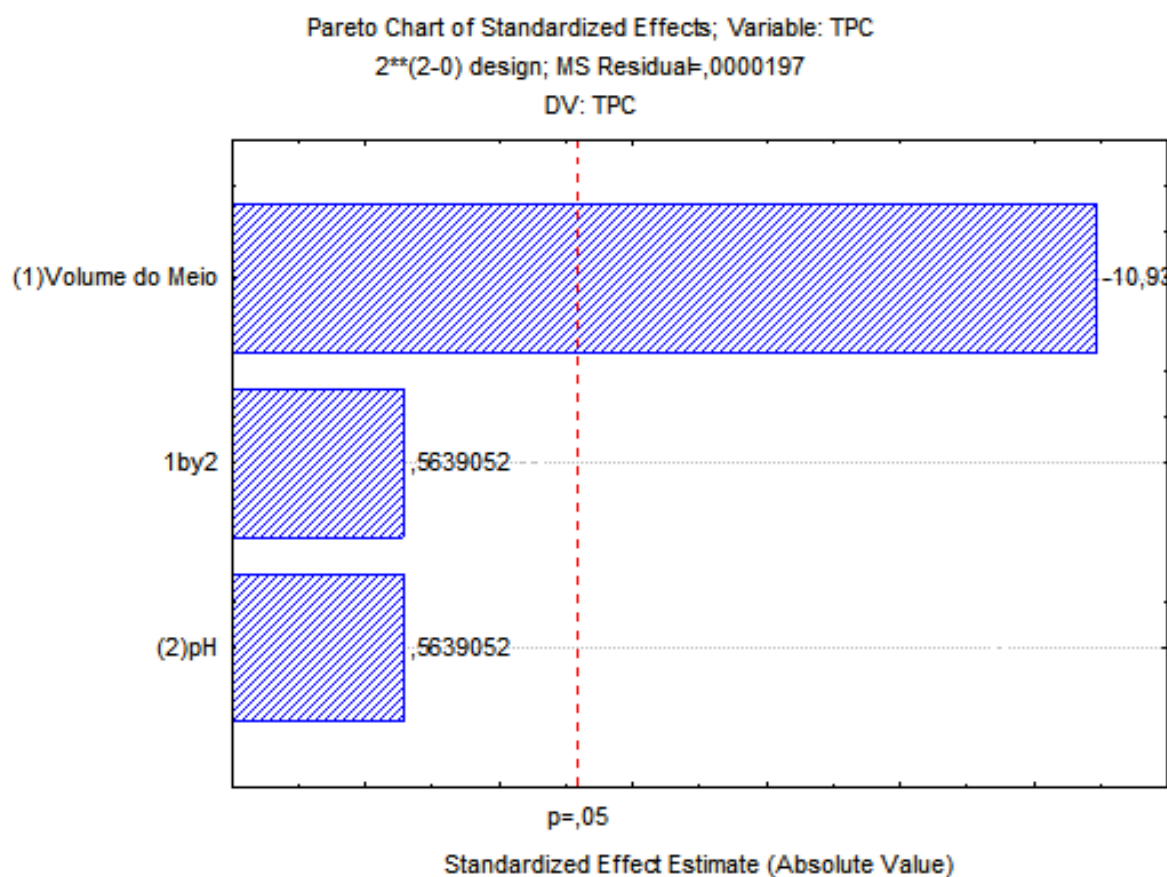
Fonte: De autoria própria.

No geral, quanto maior a intensidade da coloração modificada no ensaio, maior a incidência de compostos fenólicos na amostra, ou seja, maior a quantidade de substâncias redutoras presentes e conseqüentemente maiores os valores de absorvância, visto que a absorvância é inversamente proporcional a transmitância, uma vez que a coloração é intensificada, a passagem da luz e a transmitância

diminui, o que se mostra condizente com os resultados da Tabela 8, à medida que a concentração de fenólicos aumenta, tem-se um aumento também nos valores de absorvância.

Foi também gerado um gráfico de pareto para o TPC (Figura 12), e este apresentou como variável significativa o volume, que tem efeito negativo, indicando, portanto, que em volumes menores de solução tampão, a eficiência da dissolução é maior. Entretanto, analisando esse gráfico, observa-se que a variável pH e a interação entre pH e volume do meio não tiveram efeitos significativos na determinação do TPC.

Figura 12 Gráfico de Pareto do Teor de Fenólicos Totais



Fonte: autoria própria

6.3 Determinação das condições ótimas e validação do modelo matemático

Na Figura 13 consta os gráficos para superfícies de resposta (RSM), considerando as interações entre: pH e volume do meio; volume do eluente e volume do meio e; pH e volume do eluente. Busca-se ilustrar a região definida pelas variáveis em função máxima dissolução das cápsulas de hibisco, verificando-se que as mesmas apresentam características de pontos de sela, portanto, as coordenadas do ponto crítico não fornecem valores máximos, nem mínimos. Na Tabela 9 constam valores de alguns parâmetros obtidos através da RSM.

Tabela 9 Coeficientes da regressão linear, desvio padrão dos coeficientes, valores de t e probabilidade estatística p dos coeficientes do modelo referente a dissolução de cápsulas de hibisco

Fatores	Coeficiente	Desvio padrão	t	p
Intercepto	4,062500	0,111293	36,50278	0,000750
X₁	0,037500	0,136305	0,27512	0,809042
X₂	-0,930000	0,100318	-6,82291	0,020813
X₃	-0,230000	0,136305	-1,68739	0,233582
X₁.X₂	-0,147292	0,100318	-1,46825	0,279765
X₁.X₃	0,435208	0,136305	4,33828	0,049241
X₂.X₃	0,387708	0,100318	3,86479	0,060898
X₁²	-0,307500	0,192765	-1,59521	0,251718
X₂²	-0,362500	0,192765	-1,88053	0,200779
X₃²	-0,112500	0,192765	-0,58361	0,618530

Legenda: x₁: volume do meio; x₂: pH do meio; x₃: volume de eluente.

Fonte: Dados da pesquisa.

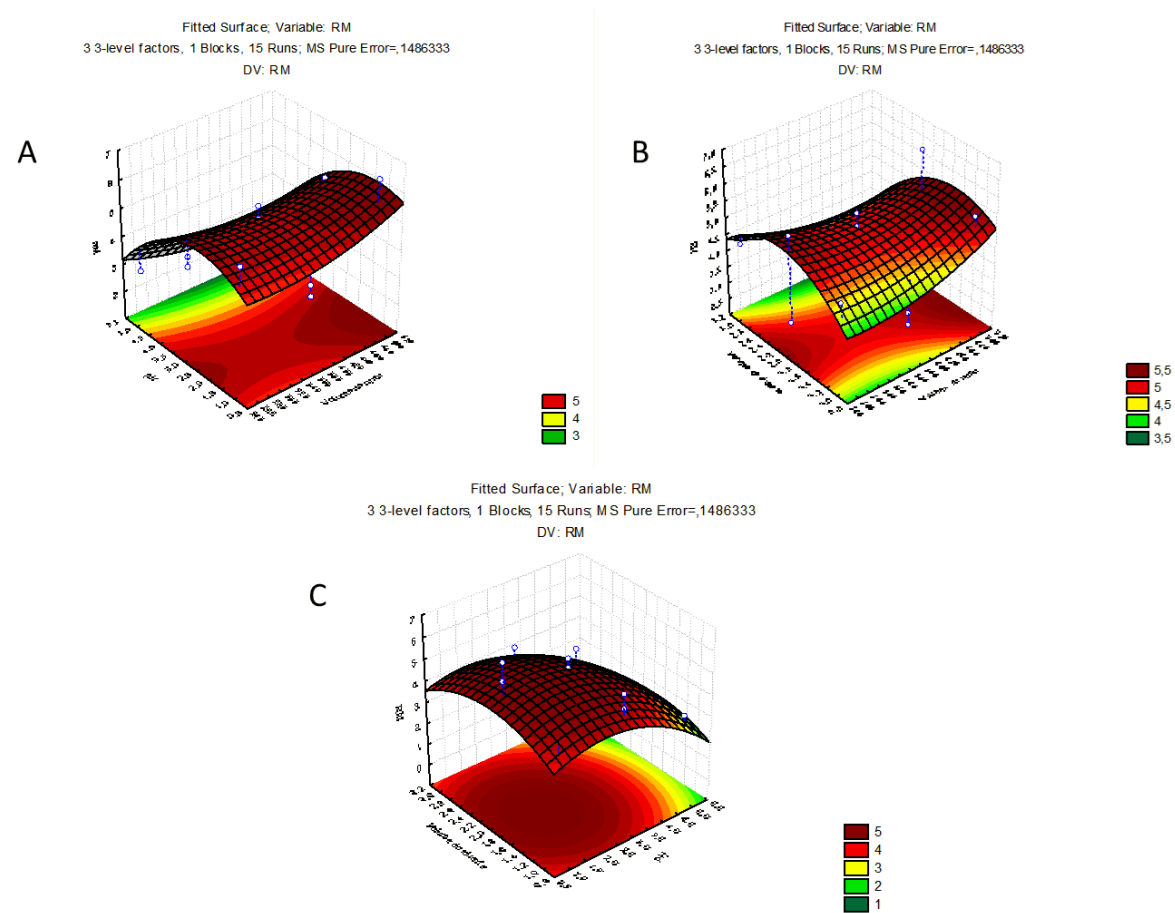
Segundo a Tabela 9, pode-se observar que apenas a variável pH (x₂) e a interação entre as variáveis volume do meio (x₁) e o volume do eluente (x₃), foram considerados estatisticamente significativa em termos lineares, considerando nível

de significância de 5% ($p < 0,05$), portanto, a Equação (9) descreve o modelo matemático considerando as parcelas estaticamente significativas.

$$RM = 4,0625 - 0,9300x_2 + 0,4352x_1x_3 \quad (9)$$

Destaca-se que a variável X_2 com maior efeito maior efeito ($p = 0,0208$), influenciando de forma inversa, ou seja, quanto maiores seus níveis, menor é a eficiência na dissolução das cápsulas de hibisco. Verifica-se também que a interação X_1X_3 também em termos linear, exerce efeito positivo sobre a dissolução.

Figura 13 Superfícies de resposta e contorno para as respostas em função das variáveis: A) pH e volume do meio, B) volume do eluente e volume do meio e C) pH e volume do eluente



Na Tabela 10 constam os efeitos para matriz do planejamento Box-Behnken, verificando-se que os valores de média quadrática, e grau de liberdade para falta de ajuste e para o erro puro, são respectivamente: 1,434700 e 3; 0,148633 e 2. Com esses valores foi calculado o F experimental seguindo a Equação 10, onde MSFA representa a média quadrática da falta de ajuste e MSEPE, a média quadrática do erro puro. O F calculado foi de 9,65261, esse resultado foi comparado com o F Tabelado considerando os graus de liberdade 3 e 2 e o nível de significância de 5%, o valor de F Tabelado corresponde a 19,16. Verificando-se, portanto, que o F experimental é menor do que o F Tabelado, e modelo não apresenta falta de ajuste. Além disso, o coeficiente de regressão linear apresentou valor $sqr = 74702$, com 74,70% de concordância ao modelo.

$$F = (MSFA/MSEPE) \quad (10)$$

Tabela 10 ANOVA dos efeitos calculados para matriz Box-Behnken

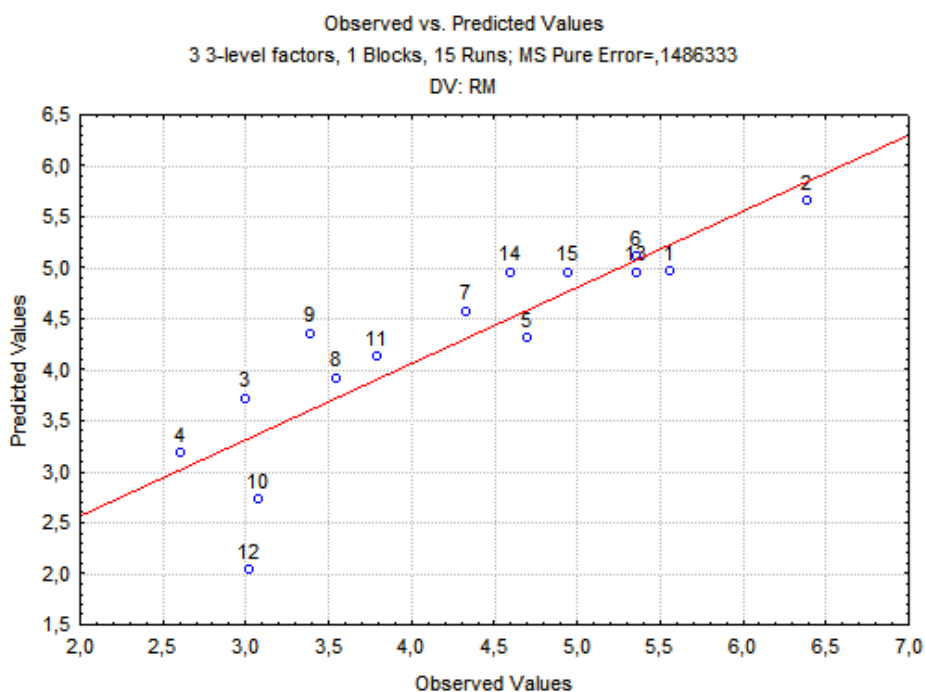
	SS	df	MS	F	P (significância)
(1) Volume do meio L+Q	0,33167	2	0,165833	1,11572	0,472653
(2) pH (L)	9,71659	2	4,858293	32,68643	0,029686
(3) Volume do eluente L+Q	2,64328	2	1,321639	8,89194	0,101092
1*2	0,37823	1	0,378225	2,54468	0,251718
1*3	0,52563	1	0,525625	3,53639	0,200779
2*3	0,05063	1	0,050625	0,34060	0,618530
Lack of Fit	4,30410	3	1,434700	9,65261	0,095324
Pure Error	0,29727	2	0,148633		
Total SS	18,20529	14			

Fonte: Dados da pesquisa.

O modelo mostrou-se com ajuste pois o coeficiente de regressão linear apresentou valor $sqr = 74702$, indicando cerca de 74,70% de ajuste ao modelo. Portanto, as condições ótimas estabelecidas foram volume do meio (333 mL), pH do meio (2) e volume do eluente (2 mL).

Como o volume utilizado no meio de dissolução é relativamente grande, pois há necessidade do contato da haste do dissolutor apenas com a solução do meio, evitando o contato direto com a cápsula, dessa forma, após o processo de dissolução, é imprescindível a realização de uma etapa de extração do dissolvido, para que os analitos possam ser pré-concentrados em um volume menor, aumentando assim a concentração dos mesmos, o limite de detecção e a sensibilidade da técnica empregada para identificação dos compostos bioativos.

Figura 14 Gráfico de probabilidade normal dos resíduos para resposta



Fonte: De autoria própria.

Também é possível verificar na Figura 14 a inspeção da normalidade comparando-se a frequência acumulada dos resíduos padronizados e a curva normal para a variável resposta, cada número corresponde a um ensaio experimental, conforme a matriz de planejamento indicada na Tabela 7.

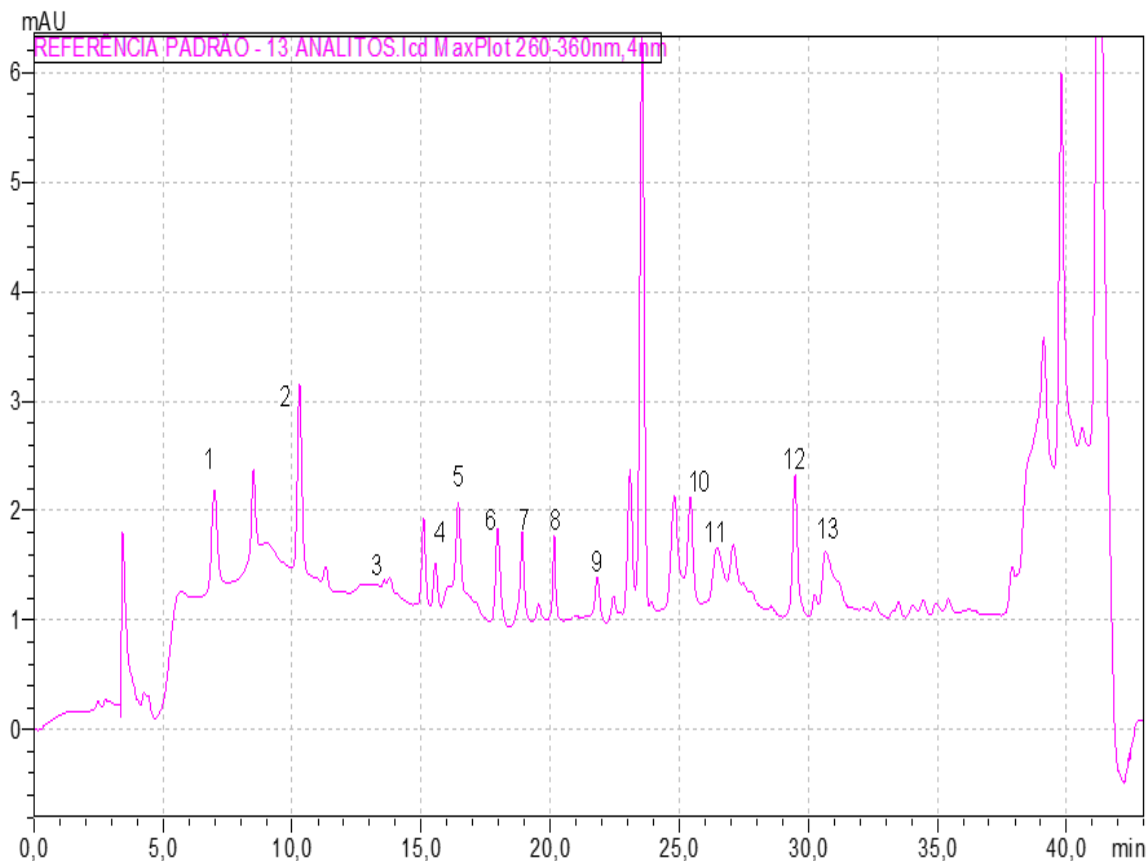
Percebe-se que os resíduos apresentam distribuição assimétrica, entretanto, o ensaio experimental 12 que apresenta condições superiores para os valores de pH e volume do eluente, e central para o volume do meio, sugerindo a presença de um *outlier*, ou seja, um ponto que está distante da linha de tendência.

6.4 Perfil cromatográfico das amostras de hibisco

A tentativa de identificação dos compostos fenólicos foi realizada por meio da comparação entre os espectros das amostras, tempos de retenção e valores de comprimento de onda dos padrões analíticos, conforme a Tabela 3 (página 44). Dos 17 analitos identificados pelo método de separação cromatográfica (MAGALHÃES, 2022), foi possível detectar um total de 13 analitos no processo de otimização, os picos dos mesmos estão mencionados no modo varredura, indicado no cromatograma presente na Figura 15.

Foram identificados, portanto: os ácidos gálico, protocatecuico, clorogênico, cafeico, sinrínico, *p*-cumárico, ferúlico, elágico e *trans*-cinâmico, bem como os flavonoides catequina, vanilina, rutina e a naringenina. Verifica-se através de estudos que os dois primeiros analitos são os principais ácidos fenólicos presentes em amostras de hibisco (CHU; CHEW; NYAM, 2021), sendo o ácido protocatecuico o mais frequentemente encontrado (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; GIBIS; ZEEB; WEISS, 2014; MOURA *et al.*, 2018). O ácido elágico normalmente aparece em folhas de *H. sabdariffa* (CHEN *et al.*, 2013) e o ferúlico, além das folhas, nos cálices da planta (CHEN *et al.*, 2013; PIMENTEL-MORAL *et al.*, 2020; ESCOBAR-ORTIZ *et al.*, 2021).

Figura 15 Cromatograma da amostra com os analitos identificados nos comprimentos de onda de 260 – 360 nm



Legenda: (1) ácido gálico (TR = 6,99); (2) ácido protocatecuico (TR = 10,29); (3) catequina (TR = 13,55); (4) ácido clorogênico (TR = 15,55); (5) ácido cafeico (TR = 16,43); (6) ácido sinríntrico (TR = 17,95); (7) vanilina (TR = 18,91); (8) ácido protocatecuico (TR = 20,16); (9) ácido ferúlico (TR = 21,82); (10) rutina (TR = 25,43); (11) ácido elágico (TR = 26,47); (12) ácido *trans*-cinâmico (TR = 29,48); (13) naringenina (TR = 30,24) e; TR: tempo de retenção.

Fonte: Dados da pesquisa.

Quatro analitos que poderiam ser separados e detectados pelo método de separação cromatográfica (MAGALHÃES, 2022), não foram identificados, esses são: quercetina, crisina, kaempferol e ácido sinápico. Entretanto, fazendo-se o paralelo com a literatura, percebe-se a quercetina foi identificada em cálices e pétalas de *H. sabdariffa* (BORRÁS-LINARES *et al.*, 2015; MAR *et al.*, 2020;

ESCOBAR-ORTIZ *et al.*, 2021), já a crisina, nas buscas atuais não foi possível encontrar nenhum estudo de avaliação do seu teor em amostras de hibisco. O kaempferol normalmente aparece nas amostras em sua forma glicosilada, e apesar de não ter sido detectado na análise das cápsulas de hibisco aparece como um dos principais constituintes de extratos de *H. cannabinus*, concentrando-se em sementes (SIM; NYAM, 2021) e em *H. sabdariffa* aparece juntamente com a quercetina (HAPSARI; MANIKHARDA; SETYANINGSIH, 2021). Uma possibilidade levantada para a não detecção de kaempferol pode estar relacionada com as condições de dissolução, visto que um estudo (ZHEN *et al.*, 2016) indicou hidrólise ácida na temperatura de 90° por tempo de 60 minutos, para sua extração, entretanto, ainda assim, houve maior contribuição de seus isômeros. Quanto ao ácido sinápico, o mesmo é descrito como principal componente em sementes de *H. cannabinus* (DHAR *et al.*, 2015; CHU; CHEW; NYAM, 2021; MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022).

6.5 Peso médio

É um teste realizado para verificar a uniformidade de peso entre as unidades de um mesmo lote de cápsulas e consiste na pesagem de 20 cápsulas individualmente. Segundo a Farmacopeia (BRASIL, 2019) o limite de variação permitida do peso médio para cápsulas duras e moles com mais de 300 mg deve ser de $\pm 7,5\%$, podendo-se tolerar no máximo duas unidades fora desse limite, em relação ao peso médio do conteúdo, porém, nenhuma poderá estar acima ou abaixo do dobro desse percentual. O DPR (desvio padrão relativo) possibilita verificar o grau de variabilidade no lote produzido, bem como avaliar a eficácia e confiabilidade do processo de produção do fármaco.

Os dados do teste realizado encontram-se listados na Tabela 11, e pode-se observar que das seis cápsulas, apenas uma não apresenta uniformidade na sua produção, que é a HIBMIX, apresentando uma variação de 9,996%, valor acima do

é aceitável, de acordo com a Farmacopeia (BRASIL, 2019), além de apresentar duas unidades fora do dobro do limite percentual permitido. O teste do peso médio é, portanto, uma forma de avaliação da uniformidade do conteúdo das cápsulas, é uma forma de contribuir com a qualidade do medicamento e garantir qualidade para o consumidor, visto que a não uniformidade fora dos limites estabelecidos, implica diretamente na quantidade do princípio ativo manipulado. Dessa forma, constatase que todas as cápsulas, com exceção da HIBMIX foram aprovadas segundo os critérios de especificação estabelecidos pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019)

*Tabela 11 Resultados da análise do peso médio de cápsulas de hibisco
com 500 mg*

	FITPI (n = 8)	FITPII (n = 20)	SMNUT (n = 20)	MTCMT (n = 20)	HIBMIX (n = 20)	CMBFIT (n = 20)
PM (g)	0,4799	0,4818	0,3876	0,4397	0,4118	0,3522
LI (g)	0,4439	0,4457	0,3585	0,4068	0,3809	0,3258
LS (g)	0,5158	0,5180	0,4166	0,4727	0,4427	0,3787
MEPI	0,4397	0,4681	0,3602	0,4007	0,3042	0,3258
MAPI	0,5007	0,4702	0,3678	0,4283	0,4558	0,3402
NAFL	1	0	0	0	2	2
NAFDL	0	0	0	0	2	0
DP	0,0179	0,0113	0,0171	0,0135	0,0412	0,0149
DPR (%)	3,721%	2,352%	4,415%	3,061%	9,996%	4,243%

Legenda: PM = peso médio; LI = limite inferior permitido em relação a $\pm 7,5\%$ de variação; LS = limite superior permitido em relação a $\pm 7,5\%$ de variação; MEPI = menor peso individual encontrado; MAPI = maior peso individual encontrado; NAFL = número de amostras fora do limite (7,5%); NAFDL

= número de amostras fora do dobro do limite (15%); DP = desvio padrão; DPR (%) = desvio padrão relativo.

Fonte: Dados da pesquisa.

6.6 Teste de desintegração

Realizou-se a desintegração de seis cápsulas de cada amostra comercial, conforme indicado pela Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2019), e foram determinados os tempos de desintegração e desvios padrão para todas as cápsulas. O teste é realizado para verificar o tempo que se leva para que a cápsula se desintegre completamente, ou seja, o tempo em que ocorre o rompimento do invólucro é um parâmetro de qualidade. Isso é realizado com a aparelhagem já especificada na seção 5.2 (página 45) e o meio sendo água, para verificar se a cápsula se desintegra dentro do tempo limite especificado pela monografia do produto. O tempo limite de desintegração para cápsulas duras é de 45 minutos, e como se pode observar na Tabela 12, todas as cápsulas obedeceram a esse limite de tempo para o ensaio de desintegração.

Tabela 12 Teste de Tukey a 5% para ensaios de desintegração

Amostras	Tempo de desintegração (min)
FITPI	2'09" ^a ± 6'56"
FITPII	20'48" ^a ± 5'87"
SMNUT	6'00" ^a ± 4'37"
MTCMT	8'17" ^a ± 2'84"
HIBMIX	20'00" ^a ± 5'53"
CMBIT	15'55" ^a ± 2'38"

Médias seguidas por pelo menos uma mesma letra na coluna não difere entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

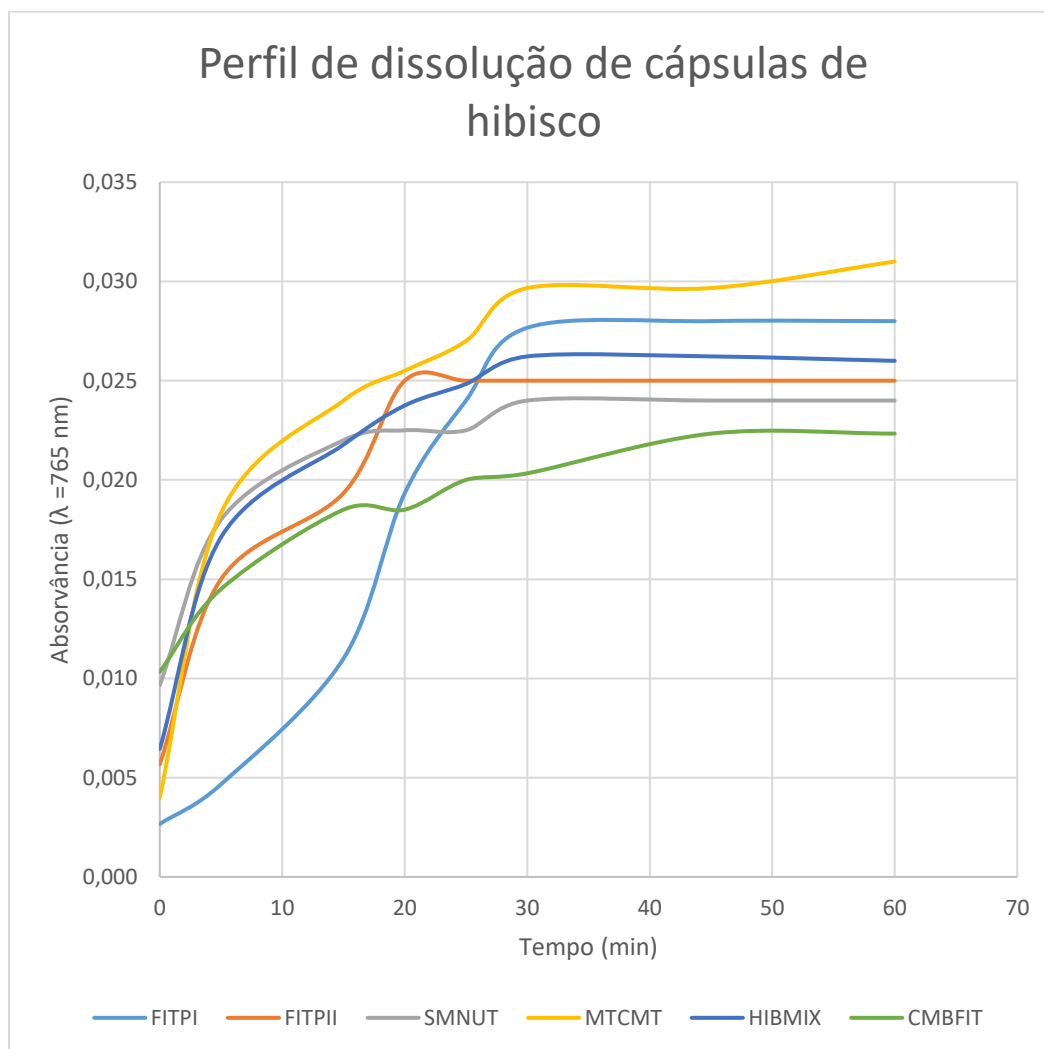
Fonte: Dados da pesquisa.

A desintegração é completa quando não resta nenhum resíduo das cápsulas na tela metálica do aparelho de desintegração, exceto quando houver partes insolúveis do material encapsulado (BRASIL, 2019). Os tempos de desintegração das amostras FITPII e HIBMIX foram relativamente superiores as demais, pois o material parede demorou mais tempo para se desintegrar, estes foram considerados desintegrados quando apenas restaram fragmentos insolúveis na tela metálica, entretanto, em conformidade com o teste Tukey, as médias de tempo de desintegração não apresentam diferenças significativas.

6.7 Teste e perfil de dissolução

O teste de dissolução possibilita determinar a quantidade de substância ativa liberada no meio de dissolução quando cápsulas são submetidas a uma aparelhagem e condições experimentais específicas, com a retirada de alíquotas entre a região intermediária, entre a superfície do meio de dissolução e a parte superior das pás, a no mínimo 1 cm de distância da parede interna do recipiente em certo intervalo de tempo após o início da dissolução (BRASIL, 2019). Após a retirada da alíquota de 10 mL o meio foi repostado com volume e condições de temperatura e pH iguais, e a alíquota retirada, filtrada para leitura em espectrofotômetro seguindo o ensaio do reagente *Folin-Ciocalteu*. Traçou-se um gráfico do perfil de dissolução das amostras (Figura 16), e como pode-se observar que o tempo médio de estabilização da dissolução para todas as amostras foi de 30 min, estabilizando completamente no último intervalo de tempo. Esse teste visa verificar desvios padrão com relação a produção das cápsulas, bem como monitorar a qualidade do produto, avaliando a porcentagem de liberação do fármaco dentro de um intervalo de tempo. Salienta-se que as condições para os ensaios foram as mesmas já otimizadas, 333 mL para o volume do meio e 2 para o valor de pH e que os ensaios foram realizados em triplicata para cada cápsula.

Figura 16 Perfil de dissolução para as amostras in natura de hibisco



Fonte: De autoria própria.

Segundo a Farmacopeia (BRASIL, 2019), a liberação de princípios ativos após o início da dissolução deve ocorrer em até 30 minutos, foi colocado o período de 90 minutos para a dissolução para melhor detalhamento do processo, e como se pode observar no gráfico (Figura 16), após os 30 minutos, que não há aumento significativo na concentração de fenólicos no meio, para a maioria das amostras;

ou seja, infere-se que a liberação dos bioativos aconteceu dentro do intervalo de tempo pré-estabelecido pela Farmacopeia.

Verificando-se os valores de concentrações de fenólicos totais em mg equivalentes de ácido gálico, no tempo de 45 min, realizou-se o teste de Tukey para verificar se há diferença estatística entre as amostras após o tempo de estabilização de liberação do fármaco, obtendo-se os valores listados na Tabela 13.

Tabela 13 Teor de fenólicos totais em amostras comerciais

Amostras	TPC (mgEqAg/100g)
MTCMT	4.947 ^a ± 546
FITPII	4.682 ^a ± 358
HIBMIX	4.020 ^a ± 109
CMBFIT	3.976 ^a ± 140
SMNUT	3.844 ^a ± 234
FITPI	3.579 ^a ± 421

Médias de seguidas por pelo menos uma mesma letra na coluna não difere entre si a 5% de probabilidade pelo teste Tukey.

Fonte: Dados da pesquisa.

Os estudos que envolvem determinações de fenólicos em amostras de hibisco, estudaram a planta *in natura*, utilizando partes principais como folhas, flores, e cálices em diferentes modos de extração para posterior quantificação dos teores, normalmente obtidos com ensaios de Folin-Ciocalteu, com resultados expressos em equivalentes de ácido gálico. Comparando-se três estudos que determinaram TPC em folhas de *H. sabdariffa* o teor de fenólicos encontra-se numa faixa de 3,2 mg a 35,4 mg/100 g (ALARCÓN-ALONSO *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013; ZHEN *et al.*, 2016), já nos cálices de *H. sabdariffa* 2,26 mg a 929 mg/100 g (HERRANZ-LÓPEZ *et al.*, 2012; ESCOBAR-ORTIZ *et al.*, 2021), e em flores, 4 696

mg a 5 602 mg/100 g (GUINDANI *et al.*, 2011; JABEUR *et al.*, 2017; ROSSATTO; BINDES; CARDOSO, 2017).

De acordo com os dados listados na Tabela 13, os valores de TPC encontrados para as cápsulas de hibisco, situaram-se na faixa de 3.579 a 4.947 mg/100 g, valores que são superiores aos normalmente encontrados em amostras *in natura*. É importante destacar que o ensaio com o reagente Folin não determina com precisão a quantidade de fenólicos presentes na amostra devido a possibilidade da existência de outros constituintes como ácido ascórbico, que podem sofrer redução, reagindo com os ácidos fosfomolibídico e fosfotungstíco, formando o complexo azul de molibdênio, conforme mecanismo descrito na Figura 10 (página 52). Além disso, existe também um fator não menos importante que diz respeito a origem geográfica do cultivo do hibisco, o que pode tornar sua composição mais ou menos rica em compostos fenólicos, bem como quais as partes da planta foram utilizadas para a produção da cápsula.

Entretanto, existem alguns trabalhos que relataram TPC com valores próximos aos encontrados para as cápsulas de hibisco, a exemplo dos seguintes estudos que envolveram: a simulação de condições fisiológicas com a submissão de cálices de *H. sabdariffa* submetidos a uma hidrólise enzimática com pepsina, obtendo-se 4.588 mg/ 100g de TPC (SÁYAGO-AYERDI *et al.*, 2021); um estudo de 25 variedades mexicanas de *H. sabdariffa*, em que os cálices foram submetidos a extrações com etanol acidificado com ácido clorídrico, obtendo-se um intervalo de 2.400 mg a 10.000 mg/ 100 g (BORRÁS-LINARES *et al.*, 2015); a extração de óleo de sementes de *H. cannabinus*, com os solventes éter de petróleo ou hexano e extração com fluido supercrítico, obtendo-se o TPC de 5.880,60 mg/100 g (CHU; CHEW; NYAM, 2021).

6.8 Analitos identificados na análise de amostras de hibisco

Ensaio de dissolução com as condições otimizadas e SPE, foram realizados com as cápsulas comerciais de hibisco, com respectivos códigos especificados na Tabela 5 (página 54), os extratos obtidos foram submetidos a análise via HPLC-DAD para comparação com os espectros de padrões analíticos. Os perfis cromatográficos das seis amostras analisadas estão representados nas Figuras 17 e 18, e na Tabela 14 constam os valores de áreas dos picos obtidos na análise dos seis extratos.

Analisando a Tabela 14, pode-se observar que os ácidos protocatecuico, ferúlico, elágico e *p*-cumárico e a naringenina, aparecem na composição de todas as seis amostras de cápsulas de hibisco analisadas. Apesar do ácido *p*-cumárico e da naringenina terem sido detectados em todas as amostras, o primeiro não é frequentemente descrito na literatura para o hibisco. Através de leituras verificou-se poucos trabalhos relacionados, em uma análise do extrato de folhas de *H. sabdariffa*, utilizou-se padrões que incluíam tanto o ácido *p*-cumárico, quanto a naringenina para verificar a presença dos mesmos e estes não foram identificados (LIN *et al.*, 2012). Já em outros trabalhos realizados o ácido *p*-cumárico foi identificado em extratos de *H. acetosella* (MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022), e em extratos de folhas e sementes de *H. cannabinus*, juntamente com a naringenina (CHU; CHEW; NYAM, 2021; SIM; NYAM, 2021).

O ácido gálico não foi determinado em todas as amostras, mas assim como os ácidos protocatecuico e ferúlico, também é descrito como um dos principais ácidos fenólicos presentes em amostras de hibisco (CHU; CHEW; NYAM, 2021). É possível verificar a presença dele e do ácido siríngico, na composição de cálices (ESCOBAR-ORTIZ *et al.*, 2021) e óleos de sementes de *H. sabdariffa* e *H. acetosella* (DHAR *et al.*, 2015). Nos extratos de folhas de *H. acetosella* e em cálices de *H. cannabinus*, registrou-se a presença do ácido gálico, além dos ácidos cafeico, e ácido clorogênico (SIM; NYAM, 2021; MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022).

Alguns fenólicos como a vanilina, rutina e os ácidos siríngico e cafeico, foram detectados em cinco das seis cápsulas de hibisco. Em relação a vanilina, na literatura consultada, encontrou-se apenas um registro da sua presença em caules e sementes de *H. cannabinus* (RYU *et al.*, 2017). Quanto ao ácido *trans*-cinâmico, o mesmo só foi detectado em uma das seis amostras analisadas, e em uma busca de estudos envolvendo a presença desse analito no perfil fenólico de hibisco, não se obteve resultados para o presente ácido.

Quanto a catequina e rutina, os mesmos foram detectados em praticamente todas as amostras, sendo o primeiro analito encontrado comumente em folhas e cálices de *H. sabdariffa* (LIN *et al.*, 2012; CHEN *et al.*, 2013; ESCOBAR-ORTIZ *et al.*, 2021) e em óleos, extratos de sementes (MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022) e folhas de *H. cannabinus* (CHU; CHEW; NYAM, 2021). Já, a rutina, é registrada em extratos de flores de (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014) e cálices *H. sabdariffa* (ALARCÓN-ALONSO *et al.*, 2012; ZHEN *et al.*, 2016; ALARA *et al.*, 2020).

As duas espécies de hibisco mais cultivadas e economicamente importantes são o *H. sabdariffa* e *H. cannabinus*, entretanto, o *H. acetosella* também vem sendo amplamente utilizada e cultivada no Brasil (MANDAJI; PENA; CHISTÉ, 2022). Nos rótulos das amostras analisadas, não há descrição das informações referentes ao tipo de hibisco utilizado para o encapsulamento, bem como a parte da planta que foi utilizada (caule, flores, folhas ou sementes), sendo essas informações importantes para comparar os dados presentes na literatura com maior fidedignidade. Dos analitos identificados na análise, o ácido *trans*-cinâmico, foi identificado em apenas uma amostra e não se obteve resultados de outros estudos que relatem sua identificação em amostras de hibisco.

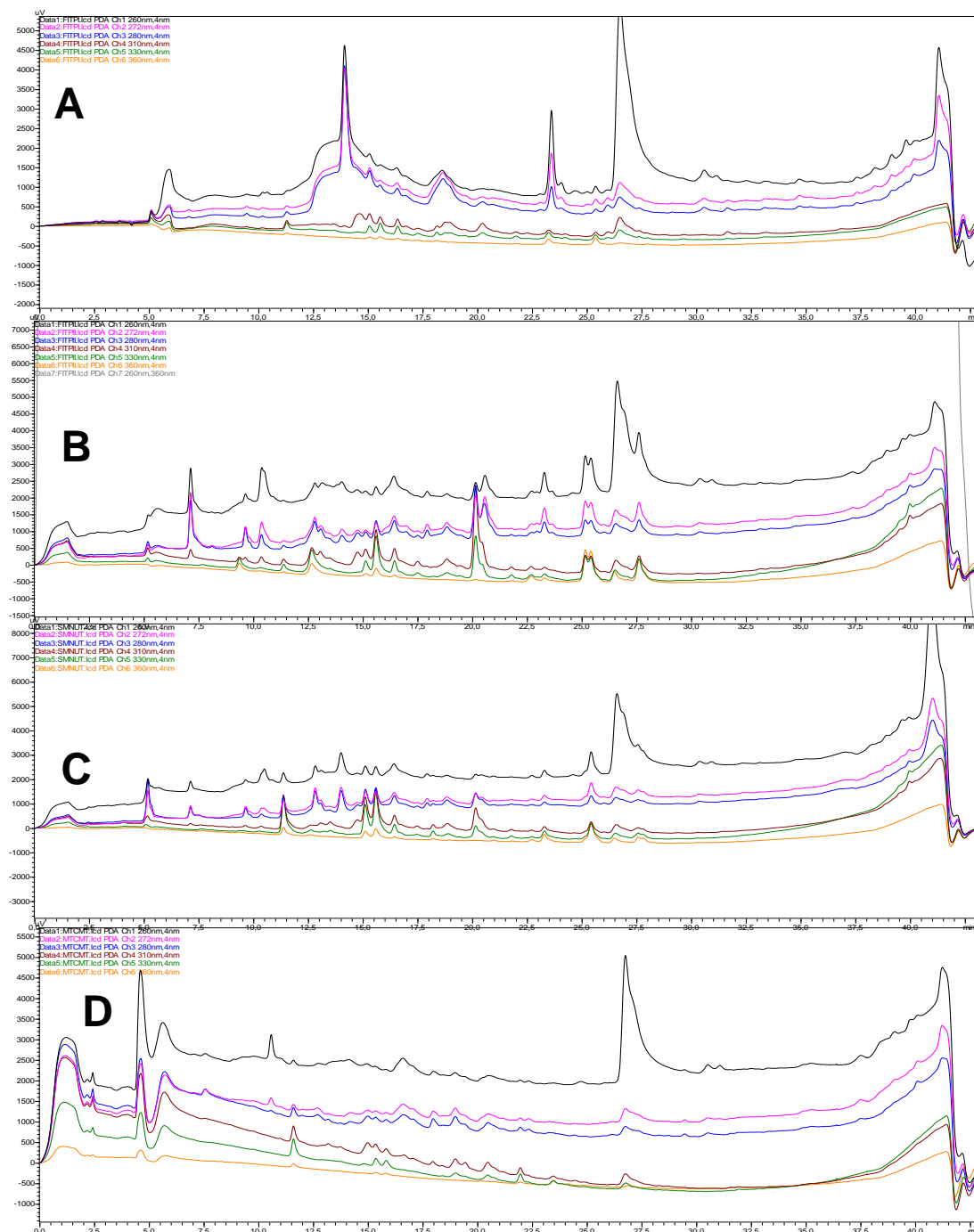
Tabela 14 Médias das áreas de analitos identificados em produtos comerciais contendo hibisco na forma de cápsulas

Analito identificado	FITPI (u.a)	FITPII (u.a)	SMNUT (u.a)	MTCMT (u.a)	HIBMIX (u.a)	CMBFIT (u.a)
AP	3.345 ^d ± 143	17.710 ^b ± 578	7.873 ^c ± 552	6.320 ^c ± 891	6.410 ^c ± 484	48.049 ^a ± 1.502
AE	201.478 ^{ac} ± 10.315	123.273 ^c ± 2.109	135.455 ^{bc} ± 8.948	138.585 ± 9.423	12.1187 ^c ± 73	146.066 ^b ± 419
AG	1.793 ^c ± 727	22.363 ^a ± 287	6.569 ^b ± 854	ND	ND	ND
AS	23.840 ^a ± 6.870	2.424 ^b ± 76	1.804 ^b ± 74	3.186 ^b ± 158	ND	17.408 ^a ± 1.861
CT	49.728 ^a ± 6.972	ND	1.438 ^b ± 155	1.113 ^b ± 98	12.511 ^b ± 191	ND
VL	ND	4.449 ^b ± 202	4.890 ^b ± 886	3.727 ^b ± 896	6.037 ^b ± 1.838	14.135 ^a ± 749
ATC	ND	453 ^a ± 109	ND	ND	ND	ND
NG	3.414 ^a ± 192	1.796 ^c ± 299	2.062 ^{bc} ± 296	2.557 ^b ± 230	1.727 ^c ± 138	3.379 ^a ± 278
APC	3.983 ^d ± 658	30.149 ^a ± 4.820	13.792 ^{bc} ± 4.545	5.726 ^d ± 479	6.972 ^{cd} ± 783	19.953 ^b ± 258
ACL	9.722 ^b ± 3.887	15.841 ^b ± 1.229	24.656 ^a ± 4.354	ND	9.247 ^b ± 1.874	ND
AC	2.276 ^c ± 336	3.685 ^b ± 327	4.129 ^b ± 251	ND	5.019 ^a ± 279	3.976 ^b ± 256
AF	1.101 ^c ± 122	1.452 ^c ± 379	1.485 ^c ± 154	2.268 ^b ± 237	1.637 ^{bc} ± 216	9.263 ^a ± 422
RUT	2.417 ^{bc} ± 231	13.972 ^a ± 1.041	13.611 ^a ± 2.401	ND	1.863 ^{bc} ± 53	30.978 ^b ± 357

Legenda: AG = ácido gálico; AP = ácido protocatecuico; CT = catequina; ACL = ácido clorogênico; AC = ácido cafeico; AS = ácido sinrínico; VL = vanilina; APC = ácido *p*-cumárico; AF = ácido ferúlico; RUT = rutina; AE = ácido elágico; ATC = ácido *trans*-cinamico; NG = naringenina;
 Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 17 Perfil cromatográfico de produtos comerciais contendo hibisco na forma de cápsulas (sobreposições 260 nm - 360 nm): A) FITPI; B) FITPII; C) SMNUT; D) MTCMT.

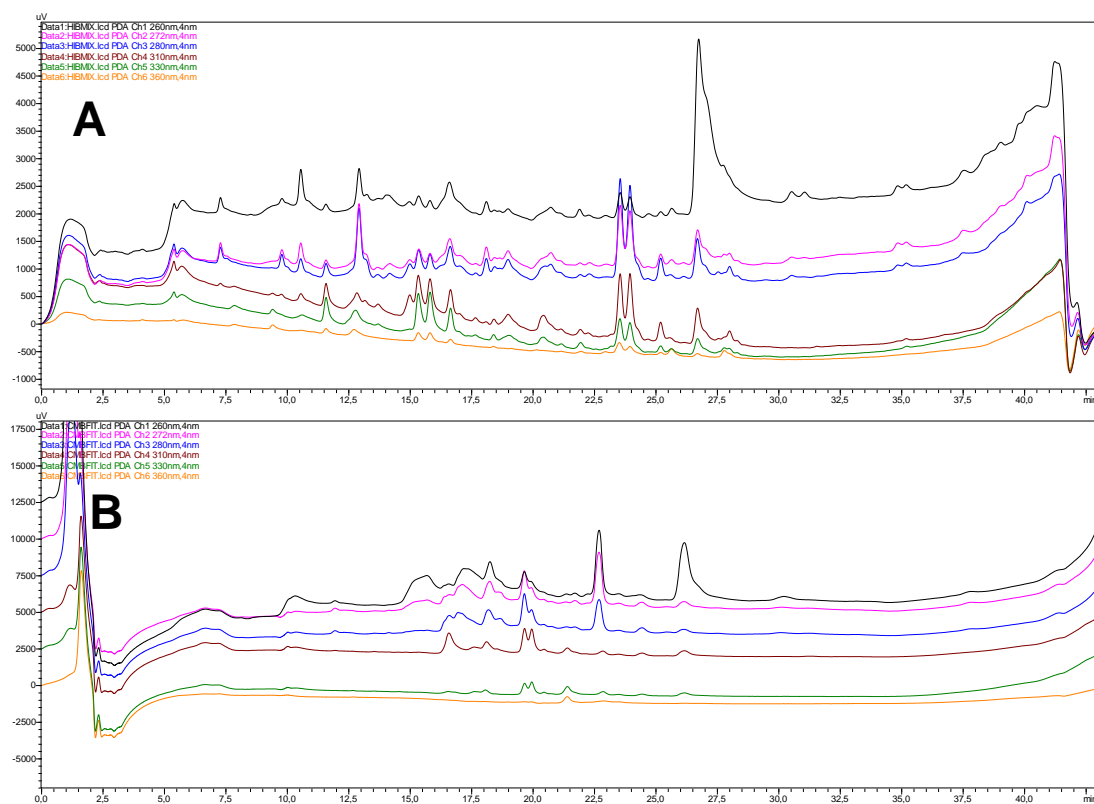
Legenda: linhas nas cores preta, rosa, azul, marrom, verde e laranja referem-se aos cromatogramas



das amostras nos comprimentos de onda 260, 272, 280, 310, 330 e 360 nm, respectivamente.

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 18 Perfil cromatográfico de produtos comerciais contendo hibisco na forma de cápsulas (sobreposições 260 nm - 360 nm): A) HIBMIX; B) CMBFIT



Legenda: linhas nas cores preta, rosa, azul, marrom, verde e laranja referem-se aos cromatogramas das amostras nos comprimentos de onda 260, 272, 280, 310, 330 e 360 nm, respectivamente.
Fonte: Dados da pesquisa.

6.9 Análise exploratória dos dados – HCA e PCA

Com base nessas informações das áreas dos analitos identificados na Tabela 14, foi realizada uma análise multivariada, obtendo-se gráficos de HCA e PCA, bem como informações complementares a respeito do conjunto dos dados e suas similaridades.

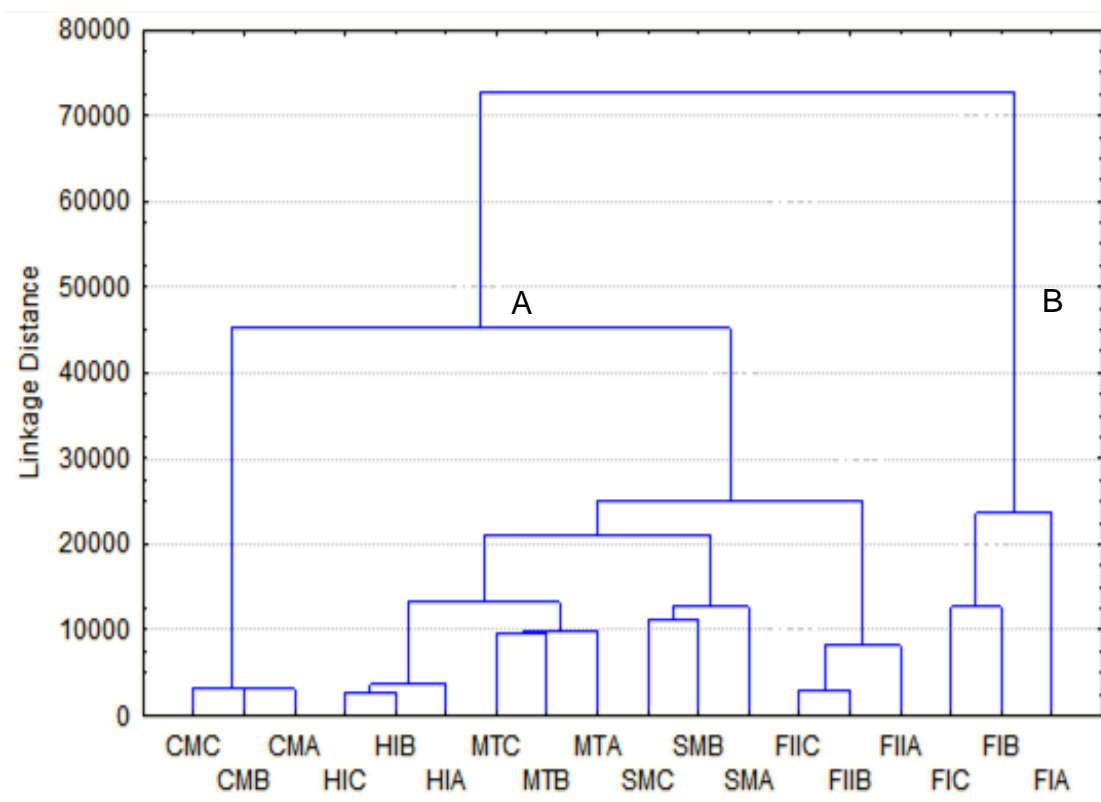
A HCA e PCA são estratégias que podem ser adotadas com o objetivo de se obter informações diversas sobre um conjunto de dados, sendo empregue em vários estudos que objetivam extração, determinação e/ou quantificação de compostos fenólicos em amostras de *H. sabdariffa*. Um estudo realizou a extração em cálices de 25 variedades de *H. sabdariffa* para caracterização do perfil fitoquímico, aplicando a metodologia de análise HPLC-DAD-ESI-TOF-MS. Como forma de verificar a semelhança entre essas 25 amostras, foi empregue a análise de componentes principais (PCA), com os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) explicando 98,70% da variância total das amostras, podendo-se inferir que as diferenças observadas entre as composições desses extratos derivaram da composição das antocianinas presentes nos mesmos (BORRÁS-LINARES *et al.*, 2015).

Em um outro trabalho, também realizado com cálices de hibisco que foram submetidos a vários ensaios de extração sólido-líquido (SLE), com modificações nas condições experimentais, e com o intuito de se identificar os compostos associados com a estabilidade de antocianinas, os extratos foram analisados via UPLC-PDA e os resultados dessa análise forneceram dados para geração de gráficos de HCA e PCA, verificando-se que os dois primeiros componentes principais (PC1 e PC2) descreveram 77,54% da variância dos dados, possibilitando inferir que os compostos fenólicos quercetina, miricetina, kaempferol-3-o-glucósido, ácido elágico e rutina são os compostos que possuem maior efeito na estabilidade das antocianinas (ESCOBAR-ORTIZ *et al.*, 2021).

Com um objetivo um pouco diferente das demais pesquisas relatadas acima, extratos de cálices de hibisco foram obtidos por meio de extração assistida por micro-ondas com diversas modificações nos parâmetros de extração e determinação do TPC. Com os dados obtidos realizou-se uma HCA para classificar e identificar semelhanças entre dez tratamentos de extração, verificando-se assim, aqueles que apresentavam maior similaridade. Após a escolha do melhor tratamento, realizou-se uma análise por HPLC-DAD-ESI-MS/MS, identificando um total de treze compostos fenólicos (CASSOL; RODRIGUES, 2019).

Percebe-se que os dados de HCA e PCA possibilitam a interpretação de resultados de uma forma muito ampla, assim, para entender melhor a distribuição dos analitos entre as cápsulas foi aplicada a Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA), obtendo-se um dendrograma (Figura 19), em que é possível observar que na distância Euclidiana próxima a 4500, no eixo y, ocorre a discriminação de dois *clusters* (A e B), indicando que os dois grupamentos estão distantes entre si. No grupo A, do lado esquerdo, estão contidas as cápsulas CMBFIT e um subgrupo com HIBMIX, MTCMT, SMNUT e FITPII, já o grupo B, do lado direito, contém apenas a amostra FITPI. A HCA visa exibir os dados em um espaço bidimensional enfatizando seus agrupamentos e padrões naturais, enquanto a distância entre os pontos, reflete a similaridade de suas propriedades, possibilitando a determinação da semelhança entre amostras, de tal forma, o dendrograma obtido, representa as relações de similaridade em termos de composição química das cápsulas de hibisco.

Figura 19 Dendrograma obtido pela Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA) de cápsulas de hibisco em relação as áreas analíticas obtidas com a integração dos picos cromatográficos identificados via HPLC-DAD

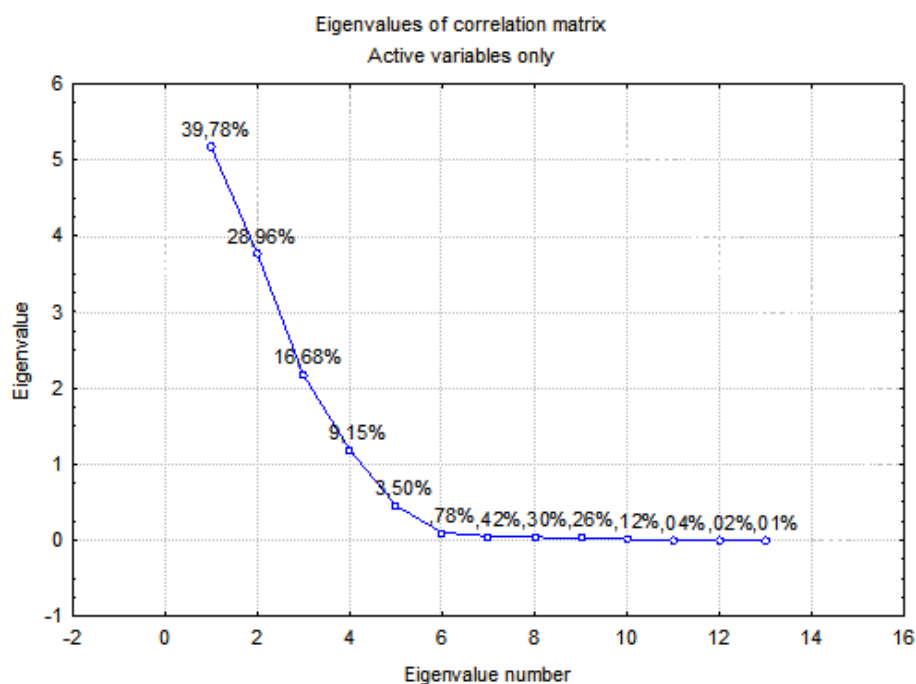


Legenda: CMA/CMB/CMC = triplicata da amostra CMBFIT; HIA/HIB/HIC = triplicata da amostra HIBMIX; MTC/MTCB/MTC = triplicata da amostra MTCMT; SMA/SMB/SMC = triplicata da amostra SMBFIT; FIIA/FIIB/FIIC = triplicata da amostra FITPII; FIA/FIB/FIC = triplicata da amostra FITPI.
 Fonte: Dados da pesquisa.

Realizou-se uma PCA com os mesmos dados utilizados para o HCA (Tabela 14), obtendo-se os gráficos de autovalor (Figura 20), de dispersão e loadings (Figuras 21 e 22). Os gráficos de dispersão e loadings são construídos pelo agrupamento das amostras e na sua estrutura os eixos são componentes principais (PCs) onde os dados são projetados. Os autovalores fornecem a composição das PCs em relação as amostras e os dispersão e loadings, a composição das PCs em relação as variáveis.

Com relação ao gráfico de autovalor (Figura 20), é possível perceber que são necessários apenas três PCs para descrever o sistema, explicando 85,41% da semelhança entre as amostras, isso também pode ser confirmado com base na análise da Tabela 15, onde se verifica os valores de variância acumulados para as duas componentes principais, que são responsáveis pela maior parte da variância entre as amostras.

Figura 20 Gráfico de autovalor obtido pela Análise de Componentes Principais (PCA) de cápsulas de hibisco em relação as áreas analíticas obtidas com a integração dos picos cromatográficos identificados via HPLC-DAD



Fonte: Dados da pesquisa.

Além da interpretação dos valores indicados na Tabela 15, fazendo-se uma análise visual, observa-se uma inflexão do gráfico de autovalor (Figura 20) na terceira PC, o que é um critério utilizado para avaliação do número de PCs, portanto, confirma-se a utilização de três PCs para explicar a variância dos dados.

Tabela 15 Variância explicada e acumulada ao longo as componentes principais

PC	Autovalor	Variância explicada (%)	Autovalor acumulado	Variância acumulada (%)
1	5,17	39,78	5,17	39,78
2	3,76	28,96	8,94	68,73
3	2,17	16,68	11,10	85,41
4	1,19	9,15	12,29	94,57
5	0,45	3,50	12,75	98,07
6	0,10	0,78	12,85	98,84
7	0,05	0,42	12,90	99,26
8	0,04	0,30	12,94	99,56
9	0,03	0,26	12,98	99,82
10	0,02	0,12	12,99	99,94
11	0,00	0,04	13,00	99,97
12	0,00	0,02	13,00	99,99
13	0,00	0,01	13,00	100,00

Fonte: autoria própria

Muitos trabalhos empregam a PCA com o objetivo de reduzir a dimensão dos problemas multivariados e identificar os parâmetros mais significativos que descrevem o conjunto de dados a ser analisado ocasionando perda mínima em relação ao conjunto de dados originais (OLIVEIRA *et al.*, 2012). Entende-se, portanto, que a PCA é uma forma de projeção dos dados experimentais de um espaço de alta dimensão, em uma dimensão menor, substituindo um grande número de variáveis por um pequeno número de componentes principais que assim

podem explicar suficientemente a estrutura dos dados, com o primeiro PC descrevendo a maioria da variância dos dados, em seguida o segundo PC descreve uma menor variância e assim sucessivamente.

Pode-se verificar que os PC1, PC2 e PC3 são componentes principais que descrevem 39,78%, 28,96% e 16,68% das variâncias, respectivamente, totalizando 85,41%. Optou-se por realizar uma comparação gráfica da PCA com a realização de uma visualização gráfica dos autovalores para observação de formação de grupos de objetos de acordo com as suas similaridades e dos *loadings*, para avaliar a contribuição de cada variável na separação dos grupos

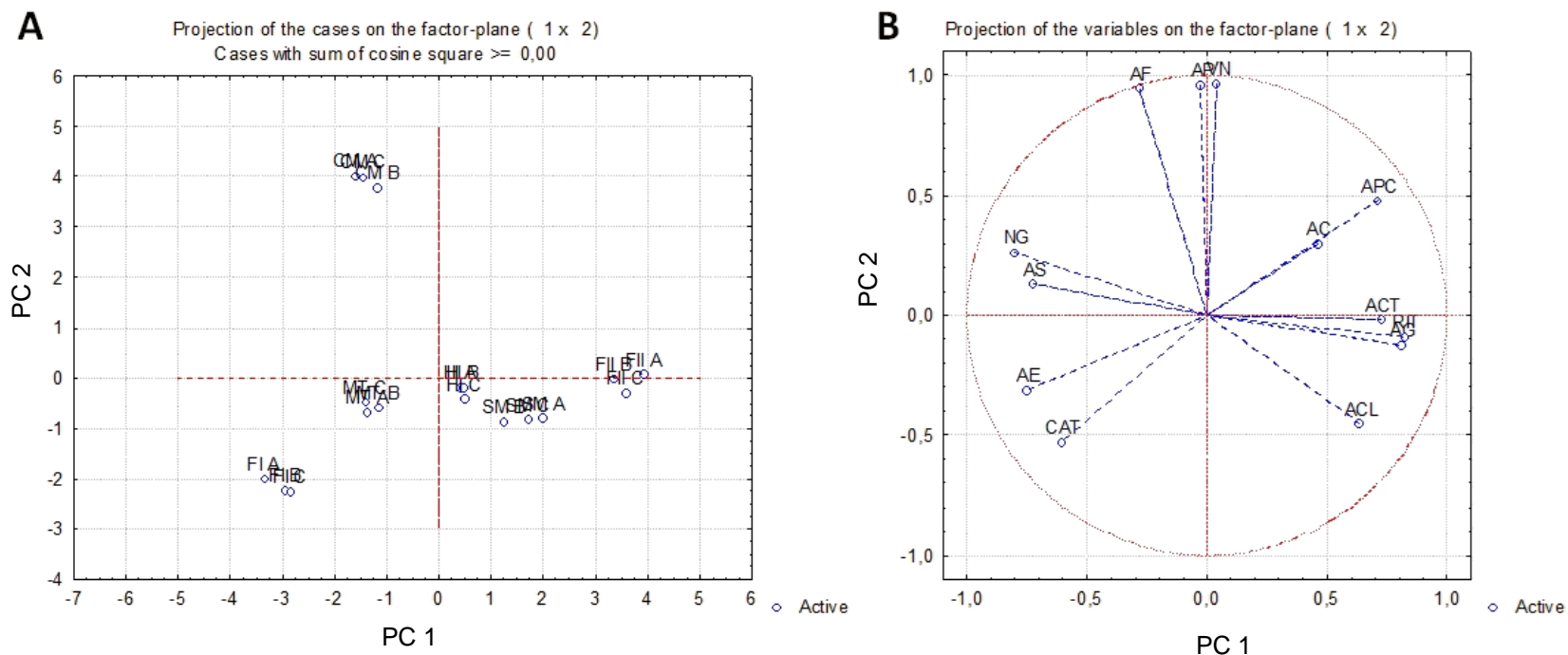
Observando o gráfico de dispersão da PCA (Figura 21-A), pode-se observar que no lado positivo da PC2 há um agrupamento da amostra CMBFIT, enquanto a parte positiva da PC1 tem um grupamento de amostras FITPII, HIBMIX e SMNUT. No lado negativo de ambas as PCs encontram-se as amostras FITPI e MTCMT. Por meio da comparação com o gráfico de *loadings* (Figura 21-B), pode-se inferir que os ácidos ferúlico e protocatecuico, influenciam na separação dos analitos presentes na amostra CMBFIT, enquanto o ácido elágico e a catequina, influenciam na separação das amostras FITPI e MTCMT e os ácidos clorogênico, gálico, *trans*-cinâmico e rutina, na das amostras FITPII, HIBMIX e SMNUT. Verifica-se que a vanilina, ácidos cafeico e protocatecuico, não estão influenciando na separação de nenhuma das amostras com relação as PCs 1 e 2, a vanilina e o ácido cafeico só são identificados em 5 das seis amostras, nesse caso a vanilina não é identificada na FITPI e o ácido cafeico não é identificado na MTCMT, enquanto o ácido protocatecuico é identificado em todas as amostras, todos apresentam áreas relativamente pequenas.

Pode-se observar pela Tabela 13 que das amostras agrupadas no lado positivo (Figura 21-A), a FITPII e HIBMIX, são as que possuem um maior teor de fenólicos totais. Ainda analisando a Tabela 13, verifica-se que das amostras, a que apresenta maior teor de fenólicos é a MTCMT, que pela Figura 21-A, pode-se observar estar agrupada no lado negativo, juntamente com a amostra FITPI, ambas

possuem um alto teor ácido elágico, apesar da primeira possuir um maior teor de fenólicos e a última um menor teor de fenólicos, comparativamente. Com relação ao componente 2, percebe-se que se agrupam no lado positivo CMBFIT, que possui uma quantidade de analitos influenciando sua separação menor a das amostras que estão no lado positivo do componente 1, entretanto, ela possui em sua composição uma maior concentração de ácidos sinríntrico, ferúlico e protocatecuico, bem como naringenina.

Analisando o gráfico de dispersão da PCA (Figura 22-A), percebe-se que as amostras HIBMIX e SMNUT, sofrem influência positiva das PCs 1 e 3, já a MTCMT sofre influência positiva em relação a PC3 e negativa em relação a PC1, CMBFIT e FITPI, sofre influência negativa das duas PCs. FITPII sofre influência positiva da PC1 e negativa da PC3. Realizando um comparativo com o gráfico de *loadings* (Figura 22-B), infere-se que nenhum analito influencia na separação das amostras HIBMIX e SMNUT, enquanto os ácidos ferúlico influencia a separação de CMBFIT e os ácidos elágico e sinríntrico, catequina e naringenina, influenciam a separação de FITPI. Ácidos clorogênico, protocatecuico, *trans*-cinâmico e gálico, e a rutina influenciam a FITPII. Destaca-se que a MTCMT não sofre influência de nenhum dos analitos, considerando as PCs 1 e 3. Aqui observa-se novamente o comportamento descrito pelo dendrograma (Figura 19), a formação de dois grupos de amostras bem característicos que possuem a separação sendo influenciada pelos analitos de forma semelhante, é o caso das amostras FITPII, HIBMIX, SMNUT e CMBFIT, para os PCs 1 e 2, e para as amostras CMBFIT, FITPI e FITPII, considerando os PCs 1 e 3.

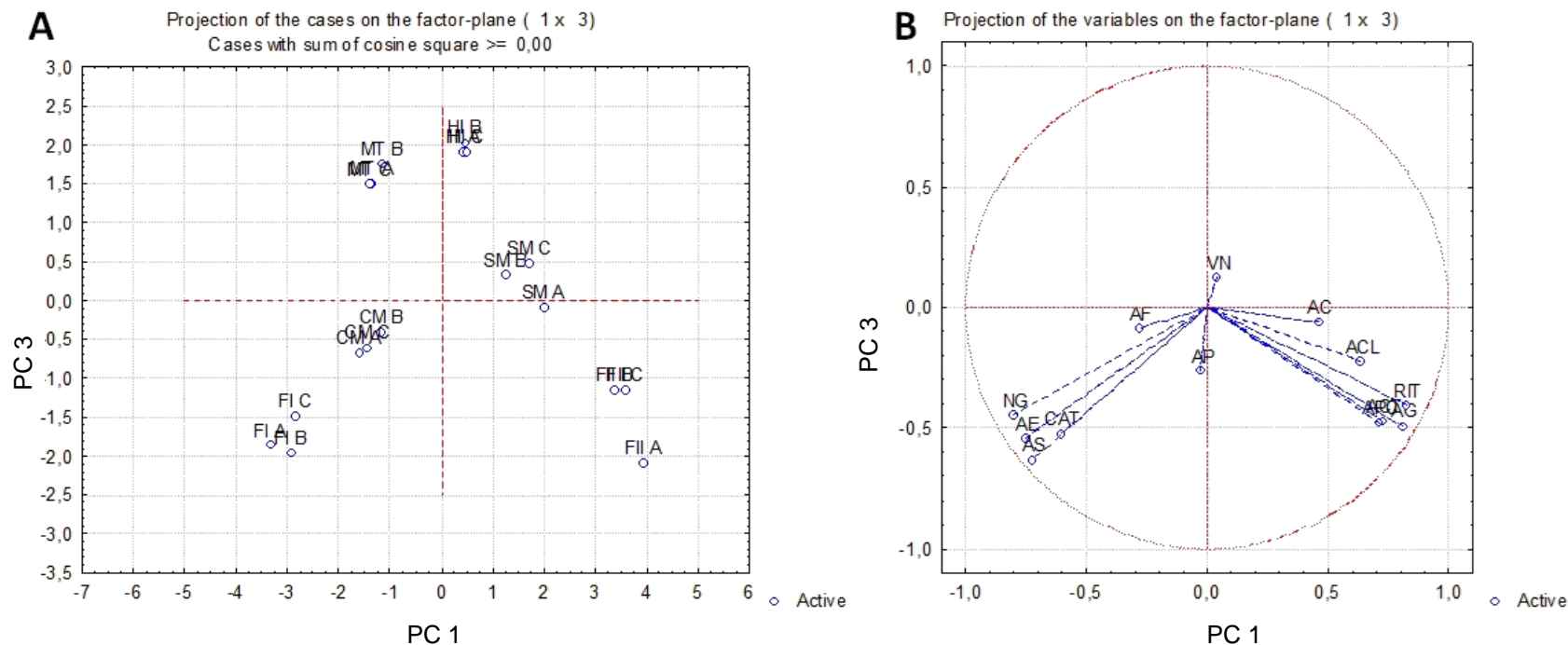
Figura 21 Diagrama de dispersão e de loadings para PCs 1 e 2



Legenda: A) gráfico de dispersão das PCs 1 *versus* 2 das amostras de cápsulas de hibisco; B) gráfico de *loadings* das PCs 1 *versus* 2 com relação a composição química de cápsulas de hibisco; analitos: (AG) ácido gálico; (AP) ácido protocatecuico; (CAT) catequina; (ACL) ácido clorogênico; (AC) ácido cafeico; (AS) ácido sinríngico; (VN) vanilina; (APC) ácido protocatecuico; (AF) ácido ferúlico; (RU) rutina; (AE) ácido elágico; (ACT) ácido *trans*-cinâmico; (NG) naringenina; amostras: FI (A-C) = FITPI; FII (A-C) = FITPII; SM (A-C) = SMNUT; MT (A-C) = MTCMT; HI (A-C) = HIBMIX e; CM (A-C) = CMBFIT.

Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 22 Diagrama de dispersão e de loadings para PCs 1 e 3



Legenda: A) gráfico de dispersão das PCs 1 versus 3 das amostras de cápsulas de hibisco; B) gráfico de *loadings* das PCs 1 versus 3 com relação a composição química de cápsulas de hibisco. Legenda: A) gráfico de dispersão das PCs 1 versus 2 das amostras de cápsulas de hibisco; B) gráfico de *loadings* das PCs 1 versus 2 com relação a composição química de cápsulas de hibisco; analitos: (AG) ácido gálico; (AP) ácido protocatecuico; (CAT) catequina; (ACL) ácido clorogênico; (AC) ácido cafeico; (AS) ácido sinrínico; (VN) vanilina; (APC) ácido protocatecuico; (AF) ácido ferúlico; (RU) rutina; (AE) ácido elágico; (ACT) ácido *trans*-cinâmico; (NG) naringenina; amostras: FI (A-C) = FITPI; FII (A-C) = FITPII; SM (A-C) = SMNUT; MT (A-C) = MTCMT; HI (A-C) = HIBMIX e; CM (A-C) = CMBFIT.

Fonte: Dados da pesquisa.

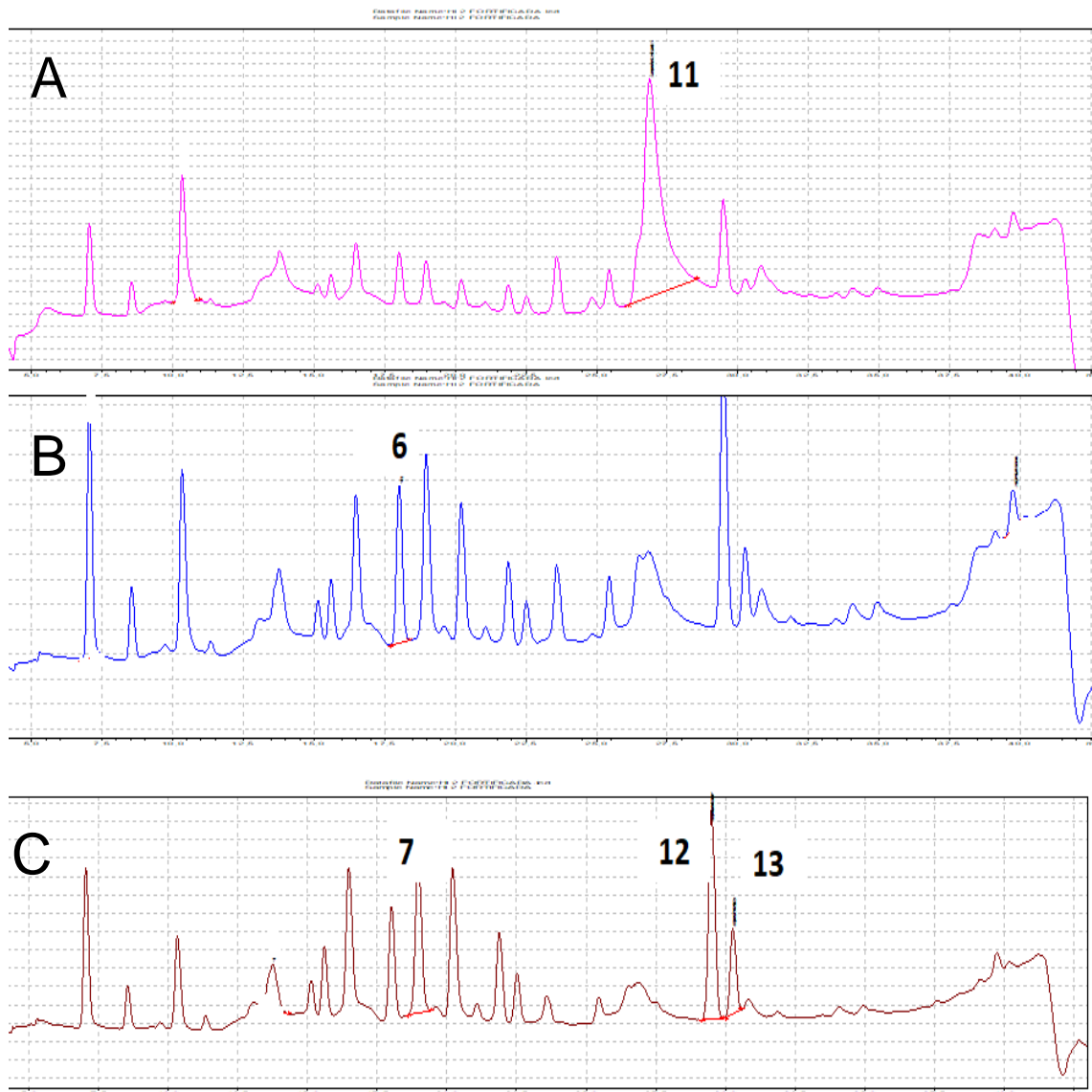
6.1 Avaliação da eficiência da separação cromatográfica

Os resultados dos parâmetros utilizados na avaliação da separação dos compostos fenólicos, encontram-se listados na Tabela 16, eles foram calculados considerando os resultados obtidos com análise dos cromatogramas com as condições otimizadas já relatadas anteriormente. Em condições ideais, as separações são realizadas eficientemente quando os valores dos fatores de retenção situam-se entre ($0,5 \leq k \leq 20$) para análises de componentes múltiplos, quando eles são inferiores ou superiores a esses valores, significa que o analito permanece mais tempo retido na coluna cromatográfica e o tempo de eluição aumenta, ocasionando um aumento na largura da base, o que impacta negativamente na resolução. Verifica-se, portanto, que os para todos os analitos identificados, os valores do fator de retenção estão dentro dos limites aceitáveis, destacando-se que o ácido gálico é o analito que apresentou menor valor de fator de retenção ($K = 0,96$), enquanto o maior valor de K foi para a naringenina ($k = 7,47$), fato esse que pode ser evidenciado com as características do pico cromatográfico (Figura 23).

Além do fator de retenção, estima-se que a resolução (R_s) tenha valores maiores do que 1 (ARAGÃO *et al.*, 2009) para que a separação possa ser considerada razoavelmente eficiente e o número de pratos teóricos (N), tenha valores superiores a 2000. Como pode-se observar na Tabela 16, avaliando-se esses parâmetros, pode-se considerar a separação eficiente para todos os 13 analitos identificados, mesmo considerando a existência de 11 compostos desconhecidos com tempos de retenção distintos e próximos as saídas dos compostos fenólicos identificados, o que devido a eficiência da separação não interferem na análise. Pode-se verificar que os compostos que apresentam menor e maior resolução são a naringenina ($R_s = 1,1$) e o ácido gálico ($R_s = 8,40$), respectivamente, em contraste ao fator de retenção, indicando que quanto maior o tempo de permanência de um analito na coluna cromatográfica, maior o fator de retenção e possivelmente, menor a resolução do pico cromatográfico. O número de pratos teóricos é um fator que avalia principalmente o desempenho da coluna e

todos os analitos apresentam valores superiores aos limites estabelecidos, tendo o ácido protocatecuico (N = 3 831) e a rutina (N = 72 402), menor e maior números de pratos teóricos, respectivamente.

Figura 23 Cromatogramas de amostras de hibisco com regiões de máxima absorção: A) 260 nm; B) 272 nm e C) 280 nm

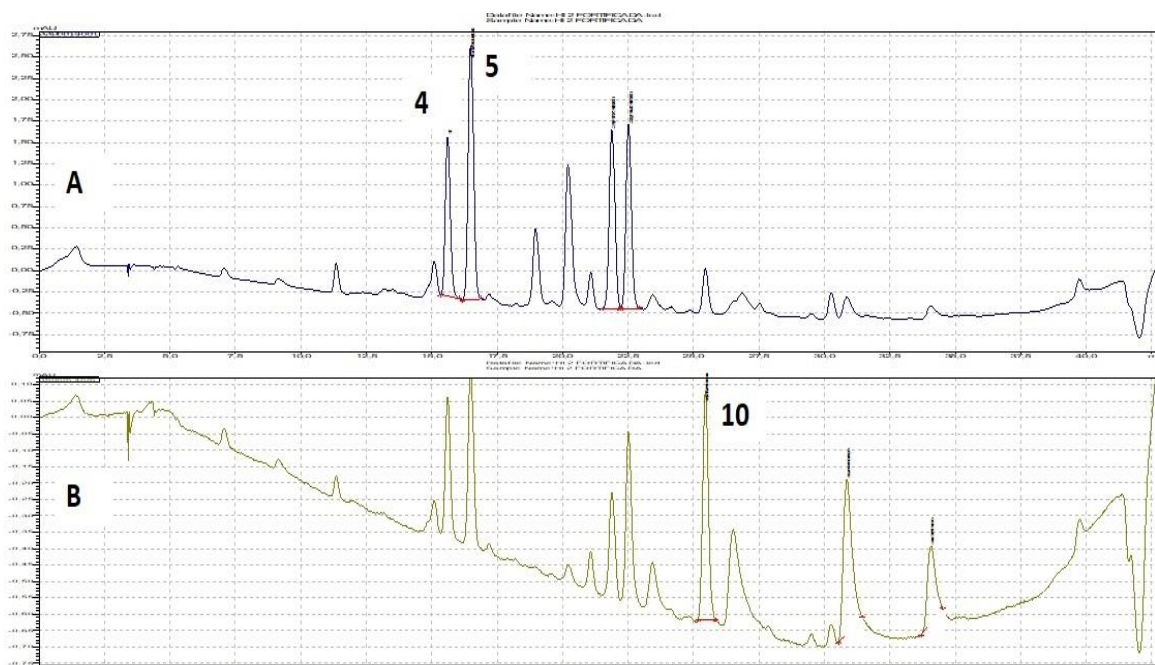


Legenda de cromatogramas obtidos para o comprimento de onda: A) 260 nm, 11 (ácido elágico); B) 272 nm, 6 (ácido sinríntrico); C) 280 nm, 7 (vanilina), 12 (ácido *trans*-cinamico) e 13 (naringenina).

Fonte: Dados da pesquisa.

Os valores de seletividade (α) para todos os analitos foram superiores a 1, indicando que a separação cromatográfica apresenta eficiência dentro desse critério, entretanto, percebe-se que alguns analitos possuem saídas da coluna com tempos de retenção próximos a de compostos desconhecidos ou de outros analitos de interesse. Tem-se por exemplo, o ácido clorogênico (TR = 15,60) que tem saída após um composto desconhecido D6 (TR = 15,13), e precede os compostos fenólicos ácido cafeico (TR = 16,48), ácido sinríntrico (TR = 18,00), vanilina (TR = 18,94) e um D7 (TR = 19,58), nesses casos, pode-se modificar a leitura para o comprimento de onda de máxima absorvância, do composto de interesse, isso foi verificado para o ácido cafeico ($\lambda = 330$ nm), ácido sinríntrico ($\lambda = 272$ nm) e vanilina ($\lambda = 280$ nm), conforme ilustrado nas Figuras 24-A, 23-B e C, respectivamente.

Figura 24 Cromatogramas de amostras de hibisco com regiões de máxima absorção: A) 330 nm e B) 360 nm



Legenda de cromatogramas obtidos para o comprimento de onda: A) 330 nm, 4 (ácido clorogênico) e 5 (ácido cafeico) e; B) 360 nm, 10 (rutina).

Fonte: Dados da pesquisa.

Embora os ácidos clorogênico e cafeico possuam máximos de absorvância no mesmo comprimento de onda ($\lambda = 330 \text{ nm}$), esse fator não influenciou na separação, como é possível observar na Figura 24-A, os picos cromatográficos dos dois analitos estão bem separados. Os seguintes compostos a seguir também apresentam tempos de retenção relativamente próximos: rutina (TR = 25,50), precedida de um composto desconhecido D11 (TR = 24,82), e sucedida de um composto desconhecido D12 (TR=26,18), ácido elágico (TR =26,86), ácido *trans*-cinâmico e naringenina (TR =30,67), e como forma de se obter melhores condições de separação, os comprimentos de onda de máxima absorção foi ajustado, com a rutina ($\lambda = 360 \text{ nm}$), ácido elágico ($\lambda =260 \text{ nm}$), conforme é possível observar nas Figuras 24-B e 23-A, respectivamente. Salienta-se que embora o ácido *trans*-cinâmico e a naringenina tenham máximos de absorvância no mesmo valor de comprimento de onda ($\lambda = 280 \text{ nm}$), observa-se na Figura 23-C, que os picos cromatográficos para esses dois analitos apresentem uma boa resolução, que permite uma nítida distinção entre eles.

Tabela 16 Fatores que avaliam a eficiência da separação cromatográfica do extrato com SPE

Picos cromatográficos	TR	Wb	Rs	K	α	N
D1	4,03	0,11	0,92	0,11	1,18	47.383
D2	4,10	0,07	2,58	0,13	4,20	37.226
D3	5,64	0,09	2,05	0,56	1,72	415
AG	7,08	1,11	8,40	0,96	1,77	8.791
D4	9,75	0,30	2,37	1,69	1,14	13.708
AP	10,61	0,33	2,16	1,93	1,11	11.831
D5	11,35	0,39	5,53	2,14	1,32	22.173
CT	13,80	0,31	2,88	2,81	1,13	9.060
D6	15,13	0,58	1,50	3,18	1,04	31.498
ACL	15,60	0,34	2,34	3,31	1,07	45.379
AC	16,48	0,29	3,18	3,55	1,12	20.990
AS	18,00	0,46	1,57	3,97	1,07	20.894
VL	18,94	0,50	1,23	4,23	1,04	11.388
D7	19,58	0,71	1,17	4,41	1,06	61.017
APC	20,53	0,32	1,31	4,67	1,08	3.831
AF	21,82	1,33	1,99	5,03	1,05	19.193
D8	22,77	0,63	2,14	5,29	1,04	79.030
D9	23,59	0,32	1,52	5,52	1,03	45.572
D10	24,18	0,44	1,51	5,68	1,03	83.364
D11	24,82	0,34	1,54	5,86	1,03	38.637
RUT	25,50	0,51	1,91	6,04	1,03	72.402
D12	26,18	0,38	1,12	6,23	1,03	96.546
AE	26,86	0,34	3,71	6,42	1,11	14.709
ATC	29,48	0,89	2,31	7,14	1,05	50.446
NG	30,67	0,53	1,10	7,47	1,02	58.790
D13	31,20	0,51	4,90	7,62	1,08	73.301
D14	33,49	0,46	2,80	8,25	1,05	80.224
D15	34,96	0,47	5,51	8,66	1,11	59.150

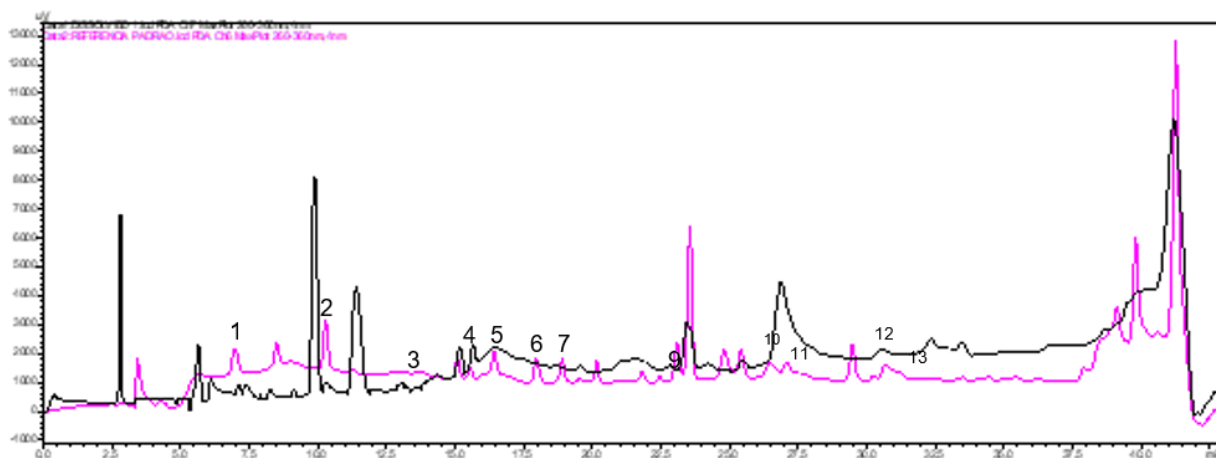
Legenda: AG = ácido gálico; AP = ácido protocatecuico; CT = catequina; ACL = ácido clorogênico; AC = ácido cafeico; AS = ácido sinrínico; VL = vanilina; APC = ácido *p*-cumárico; AF = ácido ferúlico; RUT = rutina; AE = ácido elágico; ATC = ácido *trans*-cinamico; NG = naringenina; D (1-15) = Compostos desconhecidos (1-15); TR = tempo de retenção; Wb = largura da base; k = fator de retenção; α = seletividade; N = número de pratos teóricos.

Fonte: Dados da pesquisa.

O objetivo da etapa de extração em fase sólida é aumentar a concentração dos fenólicos presentes no meio e conseqüentemente aumentar a sensibilidade da técnica de análise (HPLC-DAD), pode-se observar os dados descritos na Tabela 17 em concomitância com os cromatogramas sobrepostos (Figura 25), que quando o dissolvido é injetado diretamente no HPLC, sem essa etapa prévia, só é possível identificar a presença de 9 dos 13 analitos, ou seja, os ácidos sinríntrico (6), protocatecuico (8), *trans*-cinâmico (12) e a naringenina (13), só foram detectados após a etapa de SPE.

Verifica-se também que para a maioria dos compostos, a resposta analítica (área de integração do cromatograma), apresentou intensificação, reverberando um aumento no seu valor e para aqueles que não apresentaram esse aumento (ácidos gálico, clorogênico, cafeico e ferúlico e a rutina), de acordo com os dados da Tabela 17, que todos apresentam aumentos expressivos nos valores de resolução da separação cromatográfica.

Figura 25 Sobreposição de cromatogramas da amostra injetada sem SPE e após SPE



Legenda: (1) ácido gálico; (2) ácido protocatecuico; (3) catequina; (4) ácido clorogênico; (5) ácido cafeico; (6) ácido sinríntrico; (7) vanilina; (8) ácido protocatecuico; (9) ácido ferúlico; (10) rutina; (11) ácido elágico; (12) ácido *trans*-cinâmico; (13) naringenina. O cromatograma de cor preta refere-se a amostra sem a etapa da SPE e o cromatograma da cor rosa, o extrato após a SPE.

Fonte: Dados da pesquisa.

Assim mesmo empregando a extração em fase sólida pode-se afirmar que um aumento na concentração dos compostos analisados e desconhecidos não afetou a qualidade da separação demonstrando a seletividade do método cromatográfico.

Tabela 17 Comparação das áreas de dos picos cromatográficos para amostras sem (1) e com SPE (2)

Analitos	A1	A2	TR1	TR2	Rs1	Rs2
Ácido gálico	2890	1267	7,16	7,08	0,78	8,40
Ácido protocatecuico	6233	7351	7,39	10,61	2,13	2,15
Catequina	2737	5030	8,27	13,80	3,90	2,88
Ácido clorogênico	7874	1325	9,15	15,60	0,99	2,34
Ácido cafeico	20028	2615	9,89	16,48	2,27	3,18
Ácido sinrínico	ND	1546	-	18,00	-	1,57
Vanilina	1305	3547	18,66	18,94	1,77	1,23
Ácido r-cumárico	ND	6414	-	20,53	-	1,31
Ácido ferúlico	31196	4890	21,56	21,82	1,26	1,99
Rutina	6112	1937	22,84	25,50	1,68	1,91
Ácido elágico	117989	227956	23,45	26,86	4,12	3,71
Ácido <i>trans</i>-cinâmico	ND	1467	-	29,48	-	2,31
Naringenina	ND	4200	-	30,67	-	1,10

Legenda: A1 e A2 = áreas dos picos cromatográficos das amostras sem e com a SPE, respectivamente; TR1 e TR2 = tempos de retenção dos picos cromatográficos das amostras sem e com a SPE, respectivamente; Rs1 e Rs2 = resoluções dos picos cromatográficos das amostras sem e com a SPE; -: não detectado.

Fonte: Dados da pesquisa.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os extratos de vegetais estão cada vez mais sendo incorporados na alimentação humana na forma de suplementos alimentares, devido aos efeitos associados a saúde, como prevenção e tratamento de doenças relacionadas ao estresse oxidativo, que se atribui a presença de compostos bioativos como os compostos fenólicos. Verifica-se, portanto, que a forma farmacêutica de hibisco encapsulado tem sido bastante consumida por apresentar vantagens em relação ao manuseio e consumo, entretanto, os estudos atuais voltam-se para discussões e caracterização fitoquímica de caules, folhas, flores e sementes de amostras de hibisco *in natura*.

A utilização de ferramentas quimiométricas como o planejamento fatorial completo de dois níveis e três variáveis possibilitou a avaliação dos fatores que influenciam nos ensaios de dissolução, extração e conseqüentemente liberação do princípio ativo, bem como a aplicação do planejamento experimental Box-Behnken como metodologia de superfície de resposta para avaliação desses fatores e determinação das condições ótimas de volume do meio, pH do meio e volume de eluente. Através de cálculos da ANOVA, verificou-se o modelo desenvolvido apresentou 74,70% de adequação e não apresentou falta de ajuste. Além disso, foi possibilitado a avaliação do aumento da sensibilidade da técnica de análise com o emprego da SPE para pré-concentração dos compostos de interesse.

Dessa forma, foi possível realizar testes de desintegração, uniformidade de doses unitárias (peso médio) e construção de perfis de dissolução com as cápsulas, verificando que a maioria das cápsulas analisadas encontram dentro dos critérios de aceitação preconizados pela Farmacopeia Brasileira, bem como determinou-se o teor de fenólicos totais e caracterizou-se o perfil de fenólicos presentes em cápsulas de hibisco comercializadas na região de Salvador-Bahia, estabelecendo um comparativo entre cromatogramas de padrões analíticos e revisão da literatura. Por meio da análise de dados multivariados (HCA e PCA) foi possível gerar gráficos para compreender as similaridades entre a composição química das amostras.

8 PERSPECTIVAS

Para uma melhor caracterização dos compostos fenólicos identificados nas cápsulas de hibisco, pretende-se caracterizar o perfil fenólico dessas amostras e quantificar os analitos identificados, bem como avaliar a bioacessibilidade e biodisponibilidade, e determinar o teor de antocianinas.

REFERÊNCIAS

AKHTAR, M. et al. Encapsulation of flavonoid in multiple emulsion using spinning disc reactor technology. *Food Hydrocolloids*, v. 34, p. 62–67, jan. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X1200327X>>.

ALARA, O. R. et al. Extract-rich in flavonoids from calyces: Optimizing microwave-assisted extraction method and characterization through LC-Q-TOF-MS analysis. *Journal of Food Process Engineering*, v. 43, n. 2, p. 1–19, 20 fev. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/jfpe.13339>>.

ALARCÓN-ALONSO, J. et al. Pharmacological characterization of the diuretic effect of Hibiscus sabdariffa Linn (Malvaceae) extract. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 139, n. 3, p. 751–756, fev. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874111008725>>.

ANDRADE-EIROA, A. et al. Solid-phase extraction of organic compounds: A critical review. part ii. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, v. 80, p. 655–667, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.trac.2015.08.014>>.

ANTONIADIS, V. et al. Trace elements in the soil-plant interface: Phytoavailability, translocation, and phytoremediation—A review. *Earth-Science Reviews*, v. 171, p. 621–645, ago. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0012825216303518>>.

ARAGÃO, N. et al. EFEITO DA ACIDEZ E DE MODIFICADORES ORGÂNICOS NA DETERMINAÇÃO DE METILXANTINAS: UM EXPERIMENTO DE CROMATOGRAFIA LIQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE) EMPREGANDO OTIMIZAÇÃO UNI E MULTIVARIADA. *Química Nova*, v. 32, n. 9, p. 2482–2486, 2009.

BABAE, S.; DANESHFAR, A. Extraction of phenolic compounds from water samples by dispersive micro-solid-phase extraction. *Journal of Separation Science*, v. 39, n. 13, p. 2508–2516, jul. 2016. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jssc.201500977>>.

BARROS NETO, B. de; SCARMINIO, I. S.; BRUNS, R. E. 25 anos de quimiometria no Brasil. *Química Nova*, v. 29, n. 6, p. 1401–1406, 2006.

BARROSO, T. L. C. T. et al. Tecnologia de encapsulamento na área de alimentos: Uma revisão. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 7, p. e6210716240, 2021.

BIOATI, C. **Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante em Cálices de Hibísco (*Hibiscus sabdariffa* L.)**. Pelotas, 2009. Disponível em: <<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/item/31489/1/comunicado-213.pdf>>.

BORRÁS-LINARES, I. et al. 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, jul. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S092666901500148X>>.

BRAIBANTE, M. E. F. et al. A Química dos Chás. **Química Nova na Escola**, v. 36, n. 3, p. 168–175, 2014.

BRASIL. **Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 26, de 13 de maio de 2014**. *Diário Oficial da República Federativa do Brasil*, 2014. Disponível em: <<http://antigo.anvisa.gov.br/legislacao#/visualizar/29200>>.

BRASIL. **Farmacopeia Brasileira 5ª Ed.** (Vol. 2, pp. 1–545). 2010.

BREITKREITZ, M. C.; DE SOUZA, A. M.; POPPI, R. J. Experimento didático de quimiometria para planejamento de experimentos: Avaliação das condições experimentais na determinação espectrofotométrica de ferro ii com o-fenantrolina. um tutorial, parte iii. **Química Nova**, v. 37, n. 3, p. 564–573, 2014.

CASSOL, L.; RODRIGUES, E. Extracting phenolic compounds from *Hibiscus sabdariffa* L. calyx using microwave assisted extraction. **Industrial Crops and Products**, v. 133, p. 168–177, 2019.

CHEN, J. et al. *Hibiscus sabdariffa* leaf polyphenolic extract inhibits LDL oxidation and foam cell formation involving up-regulation of LXR α /ABCA1 pathway. **Food Chemistry**, v. 141, n. 1, p. 397–406, nov. 2013. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814613003294>>.

CHEONG, A. M. et al. Improvement of physical stability properties of kenaf

(*Hibiscus cannabinus* L.) seed oil-in-water nanoemulsions. **Industrial Crops and Products**, v. 80, p. 77–85, fev. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015304866>>.

CHEONG, A. M.; NYAM, K. L. Improvement of physical stability of kenaf seed oil-in-water nanoemulsions by addition of β -cyclodextrin to primary emulsion containing sodium caseinate and Tween 20. **Journal of Food Engineering**, v. 183, p. 24–31, ago. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0260877416300887>>.

CHEW, S. C.; TAN, C. P.; NYAM, K. L. In-vitro digestion of refined kenaf seed oil microencapsulated in β -cyclodextrin/gum arabic/sodium caseinate by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 225, p. 34–41, maio 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S026087741830030X>>.

CHORILLI; et al. Estudo de perfil de dissolução dos medicamentos de referência , genérico e similar contendo cefalexina na forma farmacêutica cápsula. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 31, n. 1, p. 69–73, 2010.

CHU, C. C.; CHEW, S. C.; NYAM, K. L. Recent advances in encapsulation technologies of kenaf (*Hibiscus cannabinus*) leaves and seeds for cosmeceutical application. **Food and Bioprocess Processing**, v. 127, p. 99–113, maio 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960308521000274>>.

COELHO, C. A.; AMORIM, B. S. Expandindo a distribuição geográfica de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): uma espécie naturalizada e negligenciada para a flora brasileira. **Hoehnea**, v. 46, n. 1, p. 1–7, 2019. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2236-89062019000100209&tlng=pt>.

CORDEIRO, S. Z. *Hibiscus acetosella* Welw. ex Hiern **Herbário Unirio**, 2022. . Disponível em: <<http://www.unirio.br/ccbs/ibio/herbariohuni/hibiscus-acetosella-welw-ex-hiern>>.

DA-COSTA-ROCHA, I. et al. *Hibiscus sabdariffa* L. - A phytochemical and pharmacological review, **Food Chemistry**, dez. 2014. . Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030881461400692X>>.

DE MOURA, S. C. S. R. et al. Microencapsulation of hibiscus bioactives and its application in yogurt. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 4, p. 1–31, 2022.

DEWI, S. R. et al. Investigating the role of solvent type and microwave selective heating on the extraction of phenolic compounds from cacao (*Theobroma cacao* L.) pod husk. **Food and Bioproducts Processing**, v. 134, p. 1–22, 2022.

DHAR, P. et al. Chemistry, phytotechnology, pharmacology and nutraceutical functions of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) and roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed oil: An overview. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 323–332, dez. 2015. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669015303654>>.

DUENAS-LOPEZ, M. A. Hibiscus cannabinus (kenaf). **CABI Compendium**, p. 2023, 7 jan. 2022. Disponível em: <<http://www.cabidigitallibrary.org/doi/10.1079/cabicompendium.27115>>.

ESCOBAR-ORTIZ, A. et al. Anthocyanins extraction from *Hibiscus sabdariffa* and identification of phenolic compounds associated with their stability. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 1, p. 110–119, 15 jan. 2021. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.10620>>.

ESTEVEZ, G. L.; DUARTE, M. C.; TAKEUCHI, C. **Sinopse de Hibiscus L. (Malvoideae, Malvaceae) do Estado de São Paulo**, Brasil: espécies nativas e cultivadas ornamentais. *Hoehnea*, v. 41, n. 4, p. 529–539, 2014.

FARAJZADEH, M. A. et al. Experimental and density functional theory studies during a new solid phase extraction of phenolic compounds from wastewater samples prior to GC–MS determination. **Microchemical Journal**, v. 177, p. 107291, jun. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0026265X22001199>>.

FAVARO-TRINDADE, C.; PINHO, S. Revisão : Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Thecnology**, v. 11, n. January, p. 103–112, 2008.

FLORES, P. das. **Hibiscus sabdariffa L.**, 2023.

GBIF SECRETARIAT. *Hibiscus radiatus cav.*, 2022.

GIBIS, M.; ZEEB, B.; WEISS, J. Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocolloids*, v. 38, p. 28–39, jul. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0268005X13003755>>.

GÓMEZ-ALDAPA, C. A. et al. A modified Achira (*Canna indica* L.) starch as a wall material for the encapsulation of Hibiscus sabdariffa extract using spray drying. *Food Research International*, v. 119, p. 547–553, maio 2019a. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996918308172>>.

GÓMEZ-ALDAPA, C. A. et al. c. *Food Research International*, v. 119, p. 547–553, maio 2019b. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996918308172>>.

GONZALEZ, A. R.; MACHADO, I. G.; TOMAZI, A. Análise dos Parâmetros de Polaridade Negativa do Processo MAG-PV sobre Distorções Angulares. *Soldagem & Inspeção*, v. 25, p. 1–15, 2020.

GUINDANI, M. et al. ESTUDO DO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DOS COMPOSTOS FENÓLICOS E ANTOCIANINAS TOTAIS DO HIBISCUS. **XX COBEQ**, Florianópolis, Santa Catarina, p. 1–7, 2011.

HAN, J. et al. Probing the specificity of polyurethane foam as a 'solid-phase extractant': Extractability-governing molecular attributes of lipophilic phenolic compounds. *Talanta*, v. 172, p. 186–198, set. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039914017305362>>.

HAPSARI, B. W.; MANIKHARDA; SETYANINGSIH, W. Methodologies in the analysis of phenolic compounds in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.): Composition, biological activity, and beneficial effects on human health. *Horticulturae*, v. 7, n. 2, p. 1–36, 2021.

HERRANZ-LÓPEZ, M. et al. Synergism of plant-derived polyphenols in adipogenesis: Perspectives and implications. *Phytomedicine*, v. 19, n. 3–4, p. 253–261, fev. 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0944711311005794>>.

JABEUR, I. et al. Hibiscus sabdariffa L. as a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. **Food Research International**, v. 100, p. 717–723, out. 2017. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996917304131>>.

JARDIM, I. C. S. F. Extração em Fase Sólida: Fundamentos Teóricos e Novas Estratégias para Preparação de Fases Sólidas. **Scientia Chromatographica**, v. 2, n. 1, p. 13–25, 2010.

JEFFERY, T. D.; RICHARDSON, M. L. A review of the effectiveness of hibiscus for treatment of metabolic syndrome. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 270, p. 113762, abr. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378874120336503>>.

LANÇAS, F. **Cromatografia líquida moderna**. 2. ed. [s.l: s.n.]

LIM, T. K. **Hibiscus schizopetalus**. *Edible Medicinal and Non Medicinal Plants*, p. 371–373, 2014.

LIN, D. et al. An Overview of Plant Phenolic Compounds and Their Importance in Human Nutrition and Management of Type 2 Diabetes. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1374, 15 out. 2016. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1420-3049/21/10/1374>>.

LIN, H. et al. Hibiscus sabdariffa leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells in vitro and in vivo. **Food Chemistry**, v. 132, n. 2, p. 880–891, maio 2012. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814611016396>>.

MAGALHÃES, B. E. **Estratégias analíticas para determinação do teor de bioativos fenólicos em farinhas integrais e suas potenciais atividades antioxidante e antibacteriana**. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2022.

MANDAJI, C. M.; PENA, R. da S.; CHISTÉ, R. C. Encapsulation of bioactive compounds extracted from plants of genus Hibiscus: A review of selected techniques and applications. **Food Research International**, v. 151, p. 110820, jan. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996921007201>>.

MAR, J. M. et al. Bioactive compounds-rich powders: Influence of different carriers and drying techniques on the chemical stability of the Hibiscus acetosella extract. **Powder Technology**, v. 360, p. 383–391, jan. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S003259101930885X>>.

MARTÍN, J. et al. Antioxidant Capacity of Anthocyanin Pigments. In: *Flavonoids - From Biosynthesis to Human Health*. [s.l.] InTech, 2017. p. 1–72.

MOURA, S. C. S. R. de et al. Encapsulating anthocyanins from Hibiscus sabdariffa L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. **Food Chemistry**, v. 241, p. 317–327, fev. 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814617314310>>.

MOURA, S. C. S. R. de et al. Release of anthocyanins from the hibiscus extract encapsulated by ionic gelation and application of microparticles in jelly candy. **Food Research International**, v. 121, p. 542–552, jul. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996918309578>>.

NG, S. et al. Influence of the inlet air temperature on the microencapsulation of kenaf (Hibiscus cannabinus L.) seed oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 115, n. 11, p. 1309–1318, 23 nov. 2013. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ejlt.201200436>>.

NGUYEN, Q. et al. Microencapsulation of roselle (Hibiscus sabdariffa L.) anthocyanins: Effects of different carriers on selected physicochemical properties and antioxidant activities of spray-dried and freeze-dried powder. **International Journal of Food Properties**, v. 25, n. 1, p. 359–374, 31 dez. 2022. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10942912.2022.2044846>>.

NGUYEN, T. T. et al. Encapsulation of Hibiscus sabdariffa L. anthocyanins as natural colours in yeast. **Food Research International**, v. 107, p. 275–280, maio 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996918301376>>.

OLIVEIRA, A. C. de et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422009000300013&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>.

OLIVEIRA, P. S. et al. Ácidos fenólicos, flavonoides e atividade antioxidante em méis de *Melipona fasciculata*, *M. flavolineata* (Apidae, Meliponini) E *Apis mellifera* (Apidae, Apini) da Amazônia. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1728–1732, 2012.

PAOLETTI, E. et al. Deciduous shrubs for ozone bioindication: *Hibiscus syriacus* as an example. **Environmental Pollution**, v. 157, n. 3, p. 865–870, mar. 2009. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0269749108005940>>.

PAULO, S. **Hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L .)**. v. 2021, n. 16, p. 1–6, 2023.

PILLAI, S. S.; MINI, S. Polyphenols rich *Hibiscus rosa sinensis* Linn. petals modulate diabetic stress signalling pathways in streptozotocin-induced experimental diabetic rats. **Journal of Functional Foods**, v. 20, p. 31–42, jan. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1756464615005046>>.

PIMENTEL-MORAL, S. et al. Pressurized GRAS solvents for the green extraction of phenolic compounds from *hibiscus sabdariffa* calyces. **Food Research International**, v. 137, p. 109466, nov. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669019307186>>.

RAJENDRAN, H. K. et al. A comprehensive review on analytical and equation derived multivariate chemometrics for the accurate interpretation of the degradation of aqueous contaminants. **Environmental Technology & Innovation**, v. 28, p. 102827, nov. 2022. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2352186422002875>>.

REZAIE, M. et al. Ultrasonic-assisted extraction of antioxidative compounds from Bene (*Pistacia atlantica* subsp. *mutica*) hull using various solvents of different physicochemical properties. **Food iChemistry**, v. 173, p. 577–583, 2015.

ROSSATTO, G. H.; BINDES, M. M. M.; CARDOSO, V. L. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE FENÓLICOS TOTAIS DO *Hibiscus sabdariffa* EMPREGANDO EXTRAÇÃO HIDROETANÓLICA. **COBEQ**, São Paulo, 2017.

RYU, J. et al. Phytochemicals and antioxidant activity in the kenaf plant (*Hibiscus cannabinus* L.). **Journal of Plant Biotechnology**, v. 44, n. 2, p. 191–202, 30 jun. 2017. Disponível em:

<<http://www.kspbtjpb.org/journal/view.html?doi=10.5010/JPB.2017.44.2.191>>.

SÁYAGO-AYERDI, S. G. et al. Bioconversion of polyphenols and organic acids by gut microbiota of predigested Hibiscus sabdariffa L. calyces and Agave (A. tequilana Weber) fructans assessed in a dynamic in vitro model (TIM-2) of the human colon. *Food Research International*, v. 143, p. 110301, maio 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0963996921002003>>.

SILVA, P. T. da et al. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. *Ciência Rural*, v. 44, n. 7, p. 1304–1311, jul. 2014. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014000701304&lng=en&tlng=en>.

SIM, Y. Y.; JESS ONG, W. T.; NYAM, K. L. Effect of various solvents on the pulsed ultrasonic assisted extraction of phenolic compounds from Hibiscus cannabinus L. **leaves**. *Industrial Crops and Products*, v. 140, p. 111708, nov. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0926669019307186>>.

SIM, Y. Y.; NYAM, K. L. Hibiscus cannabinus L. (kenaf) studies: Nutritional composition, phytochemistry, pharmacology, and potential applications. *Food Chemistry*, v. 344, p. 128582, maio 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814620324444>>.

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, dez. 2014. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814614006700>>.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. *Revista de Nutricao*, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

TAPEC, C. A. D. et al. Embryo development of woody and perennial Hibiscus species. *Scientia Horticulturae*, v. 275, p. 109698, jan. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0304423820305264>>.

YEON, S. W. et al. Three new naphthalenes from the roots of Hibiscus syriacus. *Phytochemistry Letters*, v. 33, p. 110–113, out. 2019. Disponível em:

<<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1874390019302587>>.

ZHEN, J. et al. Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of Hibiscus sabdariffa leaves. **Food Chemistry**, v. 190, p. 673–680, jan. 2016. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0308814615008845>>.