



FRANCIELLE CRISTINA TEIXEIRA

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E DISCUSSÃO DOS
SEUS MECANISMOS EM DIFERENTES EXTRATOS DE
HIBISCO (*Hibiscus rosa-sinensis* L).**

LAVRAS - MG

2019

FRANCIELLE CRISTINA TEIXEIRA

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA E DISCUSSÃO DOS SEUS MECANISMOS EM
DIFERENTES EXTRATOS DE HIBISCO (*Hibiscus rosa-sinensis L.*)**

Monografia apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do Curso de
Química, para a obtenção do título de Licenciado.

Prof. Dr. Sérgio Scherrer Thomasi

LAVRAS - MG

2019

FRANCIELLE CRISTINA TEIXEIRA

**PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA (E DISCUSSÃO DOS SEUS MECANISMOS) EM
DIFERENTES EXTRATOS DE HIBISCO (*Hibiscus rosa-sinensis L.*)
PHYTOCHEMICAL PROSPECTING AND DISCUSSION OF ITS MECHANISMS IN
DIFERENT EXTRACTS OF HIBISCUS**

Monografia apresentada à Universidade Federal
de Lavras, como parte das exigências do Curso de
Química, para a obtenção do título de Licenciado.

APROVADO em 10 de dezembro de 2019.

Dr. Sérgio Scherrer Thomasi UFLA

Dra. Luciana Lopes Silva Pereira UFLA

Dra. Elisângela Jaqueline Magalhães UFLA

Prof. Dr. Sérgio Sherrer Thomasi

Orientador

LAVRAS - MG

2019

Ao Universo por me conceder tantas oportunidades gratificantes, mesmo que muitas delas eu não reconheça.

A minha mãe, Lecir, minhas irmãs, minha avó, minhas melhores amigas, meu namorado e, minhas psicólogas, por me proporcionarem essa experiência, me apoiarem em todo percurso e acreditarem em mim, quando eu mesma não era mais capaz.

Aos meus tios Ary e Milces pelo exemplo de profissionais exímios.

Dedico.

RESUMO

O *Hibiscus rosa-sinensis L.* é uma planta originária da Índia, Suldão e Malásia, que posteriormente foi levada a outros continentes. As plantas medicinais são utilizadas há milhares de anos pela humanidade e este setor vem crescendo no Brasil e no mundo. Dessa forma, o presente trabalho é importante, pois apesar do hibisco ser popularmente utilizado na forma de chás, ainda não há muito embasamento científico quanto sua ação emagrecedora, hipoglicemiante e, como forma de prevenção para algumas inflamações e hipertensão. O estudo foi dividido em coleta da amostra, preparação do material vegetal, extração de metabólitos com diferentes solventes de polaridades distintas, para posterior identificação de possíveis classes afins e, através dos testes fitoquímicos encontrar uma forma de elucidação entre as classes de metabólitos primários e secundários presentes e seu possível efeito no metabolismo humano, juntamente com a discussão dos mecanismos de identificação. As classes de metabólitos identificadas nos testes fitoquímicos foram carboidratos, catequinas, ácidos orgânicos, esteroides e triterpenoides, aminoácidos, saponinas e taninos. A diferença de polaridade dos solventes extraiu variadas classes de metabólitos das flores de *Hibiscus rosa sinensis L.* As regiões polares ou apolares das moléculas atraem positiva, ou negativamente outras moléculas, quando os extratos são submetidos ao sistema de refluxo. A literatura não é clara quanto ao mecanismo dessas reações de identificação das classes de metabólitos primários e secundários, então alguns mecanismos detalhados das classes identificadas foram propostos, de acordo com a identificação das classes presentes nos extratos. Dessa forma, com seus mecanismos propostos e ponderados é possível conceber uma contribuição para futuras pesquisas na área.

PALAVRAS-CHAVE: *Hibiscus rosa-sinensis L.*, caracterização fitoquímica e mecanismos de reação.

ABSTRACT

Hibiscus rosa-sinensis L. is a plant originally from India, South Sudan and Malaysia, which was later taken to other continents. Medicinal plants have been used for thousands of years by humans and this sector has been growing in Brazil and worldwide. Thus, the present work is important because, although the hibiscus is popularly used in the form of teas, there is still not much scientific basis regarding its weight loss, hypoglycemic action and its use as a form of prevention for some inflammations and hypertension. The study was divided into sample collection, preparation of plant material, and extraction of metabolites with different solvents of different polarities for subsequent identification of possible related classes. In addition, it aimed to elucidate classes of the primary and secondary metabolites present through phytochemical tests and investigate their effects and possible effect on human metabolism, together with the discussion of identification mechanisms. The classes of metabolites identified in the phytochemical tests were carbohydrates, catechins, organic acids, steroids and triterpenoids, amino acids, saponins and tannins. The polarity difference of the solvents extracted various classes of metabolites from the flowers of *Hibiscus rosa sinensis L.* The polar or nonpolar regions of the molecules positively or negatively attract other molecules when the extracts are subjected to the reflux system. The literature is unclear as to the mechanism of these reactions identifying the primary and secondary metabolite classes; therefore, some detailed mechanisms of the identified classes have been proposed, according to the identification of the classes present in the extracts. Thus, with the proposed and considered mechanisms, it is possible to conceive a contribution to future research in the area.

Keywords: *Hibiscus rosa-sinensis L.*, phytochemical characterization, mechanisms reactions.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - ESPÉCIE DE HIBISCO UTILIZADA NA PESQUISA (<i>HIBISCUS SABDARIFFA</i> .)	13
FIGURA 2 - VARIAÇÃO DA ESPÉCIE DE HIBISCO.....	14
FIGURA 3- VARIAÇÃO DA COR DAS PÉTALAS DE HIBISCO.	14
FIGURA 4 - ESPÉCIE <i>HIBISCUS ROSA-SINENSIS L.</i>	14
FIGURA 5 - VARIAÇÃO DA COR DAS PÉTALAS DE HIBISCO.	15
FIGURA 6 - VIA DE OBTENÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	17
FIGURA 7 - ÁCIDOS ORGÂNICOS.	18
FIGURA 8 - MOLÉCULAS DE GLICOSE, LACTOSE, SACAROSE E OUTROS POLISSACARÍDEOS.....	19
FIGURA 9 – EPIGALOCATEQUINA.	20
FIGURA 10 - TERPENOS.	21
FIGURA 11 - ESQUEMA DE FORMAÇÃO DE PROTEÍNAS.	22
FIGURA 12 - ESQUEMA GERAL DE UMA SAPONINA.	23
FIGURA 13 - ESTRUTURA GERAL DE UM TANINO.	24
FIGURA 14 - IMAGEM DO SISTEMA DE REFLUXO UTILIZADO PARA REALIZAÇÃO DOS EXTRATOS.	27
FIGURA 15 - EXTRATOS APÓS FILTRAÇÃO.....	27
FIGURA 16 - REAÇÃO POSITIVA PARA O TESTE DE ÁCIDOS ORGÂNICOS.	35
FIGURA 17 - REAÇÃO DE DESIDRATAÇÃO E REARRANJO DE CARBOIDRATO.	36
FIGURA 18 - MECANISMO DA REAÇÃO DE DESIDRATAÇÃO E REARRANJO DO CARBOIDRATO.	36
FIGURA 19 - CONDENSAÇÃO ENTRE HIDROXIMETILFURFURAL E O ALFA-NAFTOL.	37
FIGURA 20 - MECANISMO DA REAÇÃO DE CONDENSAÇÃO ENTRE O ALDEÍDO E DUAS MOLÉCULAS DE ALFA-NAFTOL.	38
FIGURA 21 - REAÇÃO GERAL ENTRE UMA CATEQUINA E VALINA EM MEIO ÁCIDO.....	39
FIGURA 22 - MECANISMO DE REAÇÃO ENTRE UMA CATEQUINA E VALINA.....	39
FIGURA 23 - OUTROS POSSÍVEIS PRODUTOS DA REAÇÃO.....	40
FIGURA 24 - MECANISMO DE REAÇÃO DO TESTE PARA ESTEROIDES E TERPENOIDES.....	41
FIGURA 25 - REAÇÃO ENTRE AMINOÁCIDOS E NINHIDRINA.	42
FIGURA 26 - FORMAÇÃO INICIAL DE IMINA ENTRE A NINHIDRINA E O AMINOÁCIDO.	43
FIGURA 27 - DESCARBOXILAÇÃO DO AMINOÁCIDO CONECTADO À NINHIDRINA.	43
FIGURA 28 - LIBERAÇÃO DA UNIDADE DE ALDEÍDO A PARTIR DO INTERMEDIÁRIO DESCARBÓXI-IMINA.	44
FIGURA 29 - ACOPLAMENTO DO INTERMEDIÁRIO 2-AMINO-NINHIDRINA COM UMA SEGUNDA MOLÉCULA DE NINHIDRINA.	44
FIGURA 30 - MECANISMO DA REAÇÃO DE COMPLEXAÇÃO COM Fe^{3+}	45
FIGURA 31 - MECANISMO DA REAÇÃO DE ACOPLAMENTO OXIDATIVO INDUZIDA POR Fe^{3+}	46
FIGURA 32 - ESPUMA FORMADA NO TESTE DE SAPONINAS	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - RELAÇÃO ENTRE MASSA DE FLOR E VOLUME ADICIONADO DE SOLVENTE.	26
TABELA 2 - PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DAS FLORES DE HIBISCO PARA EXTRATOS DE METANOL.	32
TABELA 3 - PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DAS FLORES DE HIBISCO PARA EXTRATOS DE ACETATO DE ETILA.	33
TABELA 4 - PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DAS FLORES DE HIBISCO PARA EXTRATOS DE HEXANO.	33

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1	Espécie	13
2.2	Metabólitos secundários	16
2.3	Ácidos orgânicos	18
2.4	Carboidratos	18
2.5	Catequinas	19
2.6	Esteroides e terpenoides	20
2.7	Proteínas e Aminoácidos	21
2.8	Saponinas	22
2.9	Taninos	23
2.10	Otimização e determinação de compostos fitoquímicos	25
3	OBJETIVO	25
4	MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1	Obtenção do material vegetal	26
4.2	Obtenção dos extratos	26
4.3	Triagem fitoquímica dos extratos vegetais	28
4.3.1	Ácidos orgânicos	28
4.3.2	Carboidratos (Reação de Molish)	28
4.3.3	Polissacarídeos	28
4.3.4	Aminoácidos (Reação de Ninhidrina)	28
4.3.5	Taninos	29
4.3.6	Catequinas	29
4.3.7	Derivados de benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas	29
4.3.8	Flavonoides	29
4.3.9	Glicosídeos cardíacos	30
4.3.10	Esteroides e triterpenoides	30

4.3.11 Depsídeos e depsídonas	30
4.3.12 Derivados de cumarina	30
4.3.13 Saponinas espumílicas	31
4.3.14 Alcaloides	31
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1 Triagem fitoquímica dos extratos obtidos	32
5.2 Ácidos orgânicos	35
5.3 Carboidratos	36
5.4 Catequinas	38
5.5 Esteroides e terpenoides	41
5.6 Aminoácidos.	42
5.7 Taninos	45
5.8 Saponinas	46
6 CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas há milhares de anos pela humanidade. No entanto, constituem um elo frágil dentro do contexto terapêutico, tanto pela regulamentação, ainda em construção, como pelo uso indiscriminado por sua taxação errada de inocuidade. O crescimento constante do setor é notório, tanto no Brasil quanto a nível mundial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 25% dos medicamentos disponíveis atualmente no mercado sejam derivados de princípios ativos vegetais, de maneira direta ou indireta. Este mercado movimenta em torno de US\$ 44 bilhões no mundo e, no Brasil, o segmento gira entre US\$ 350 e US\$ 550 milhões (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2012).

A prática fitoterápica é definida como a terapêutica baseada no uso de plantas medicinais em suas diferentes formas farmacêuticas sem o uso de substâncias ativas isoladas. A planta medicinal, em um caráter mais abrangente, é considerada como toda “espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos” [Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2013)], logo, é a base para as mais diversas formas de uso da fitoterapia, desde plantas frescas, secas, rasuradas, maceradas, trituradas, ou ainda elaboradas magistralmente ou industrialmente. Os medicamentos fitoterápicos, por sua vez, são aqueles obtidos exclusivamente de matérias-primas ativas vegetais, sem adição de substâncias ativas isoladas, nem as associações dessas com extratos vegetais e, assim como todos os medicamentos, devem oferecer qualidade, comprovação de seus efeitos terapêuticos, composição padronizada e segurança de uso.

Em 2006, o Governo Federal anunciou a Política Nacional de Plantas Medicinais e Produtos Fitoterápicos como um incentivo às pesquisas objetivando o uso seguro e racional dos produtos à base de plantas pela população brasileira (BRASIL, 2006). Neste contexto, foi publicada uma lista de 71 espécies de plantas tradicionalmente utilizadas no Brasil (RENISUS) e que o Ministério da Saúde considera promissoras como fitomedicamentos a ser prescritos e dispensados pelo programa de saúde governamental - SUS (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009).

Como as plantas de maneira geral são de fácil acesso à população, há registros de casos graves de intoxicação, podendo chegar a óbito, devido ao consumo em excesso ou indevido de algumas plantas e seus extratos, que por serem naturais, não recebem a devida atenção quanto a sua toxicidade (CAVALINI, 2005). O fator limitante para o uso consciente é a validação científica farmacológica, bem como a avaliação toxicológica. Tal interesse embasa o projeto proposto.

O hibisco é popularmente utilizado, mas ainda não apresenta muito embasamento científico no Brasil que justifique a ação hipoglicemiante e emagrecedora atribuída a ele. Há pesquisas internacionais que comprovam sua ação para esses fins, incluindo redução do risco de hipertensão e alguns tipos de inflamações. (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014; MOJICA, 2012). Pesquisas anteriores, realizadas no laboratório de bioquímica da UFLA, revelaram que esta planta apresenta um excelente potencial de inibição da enzima α -amilase pancreática in vitro (COSTA et al., 2015).

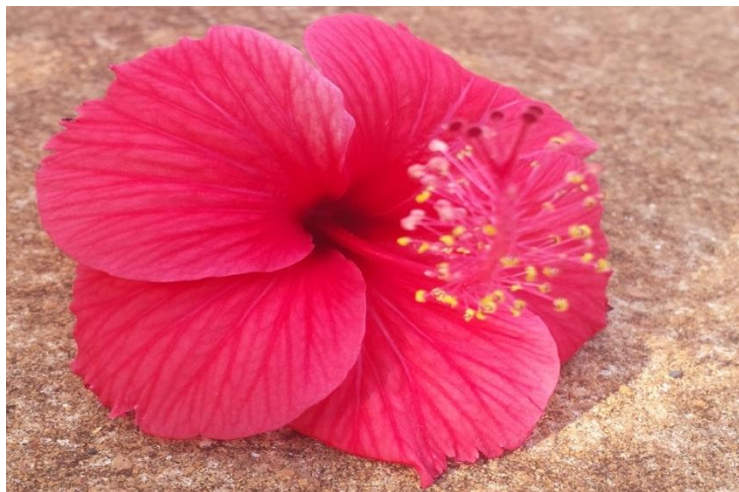
A maior parte das biomoléculas são derivadas de hidrocarbonetos, que contém átomos de hidrogênios que podem ser substituídos de forma a gerar vários grupos funcionais e, cada um deles conferem propriedades físico-químicas distintas às moléculas. Muitas dessas moléculas, por sua vez, podem se apresentar polifuncionais, sendo portanto de suma importância a localização na molécula e disposição tridimensional para uma caracterização da “personalidade” química do composto analisado (NELSON; COX, 2014).

A inibição da α -glicosidase poderá acarretar em um sinergismo da atividade inibitória e elucidar o possível mecanismo de ação. A caracterização química pela triagem fitoquímica, colaborará com o conhecimento das possíveis moléculas inibidoras. Na alopatia, a acarbose já é utilizada com esta função. Recentemente tem sido atribuída à inibição das enzimas glicolíticas α -amilase e α -glicosidase o efeito preventivo do diabetes mellitus tipo 2 (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014; HU, 2015).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Espécie

Figura 1 - Espécie de hibisco utilizada na pesquisa (*Hibiscus sabdariffa*.)



Fonte: Do autor.

O hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L. e *Hibiscus sabdariffa*) possui mais de 300 variações, como pode ser observado nas Figuras 1, 2, 3, 4 e 5. É uma planta medicinal, da família das Malvaceae, originária da Índia, do Sudão e da Malásia, que foi, posteriormente, levada para a África, Sudeste da Ásia, Europa e América Central. É conhecida por diversos nomes de acordo com sua região de incidência, dentre eles, azedinha, caruru-da-guiné, chá-da-Jamaica, papoula, quiabo azedo, quiabo-de-angola, rosélia e vinagreira. É um arbusto híbrido, perene, de tronco lenhoso ereto, que pode atingir de 2 a 3m de altura, sendo cultivada devido ao interesse em suas folhas, flores, sementes e fibras, que são utilizados na alimentação de animais, como fonte de fibras para a indústria de tecido e papel, para preparar bebidas com fins culinários e medicinais (CHIN et al., 2016; MUKHTAR, 2007; SILVA; WIEST; CARVALHO, 2016).

Figura 2 - Variação da espécie de Hibisco.



Fonte: Do autor.

Figura 3- Variação da cor das pétalas de Hibisco.



Fonte: Do autor.

Figura 4 - Espécie *Hibiscus rosa-sinensis* L.



Fonte: Do autor.

As pétalas da flor de hibisco se apresentam nas cores amareladas, vermelhas, rosas ou com centro escuro, como pode ser observado nas Figuras 1, 3, 4 e 5, e vêm sendo utilizadas para chás, infusões, geleias, licores, sobremesas, bolos e saladas, devido ao grande reconhecimento das plantas alimentícias não convencionais (PANC). Estas não fazem parte do cultivo em escala e nem ao menos organizado, entretanto, iniciativas voltadas para o resgate e preservação das mesmas, fez com que houvesse um avanço no cultivo, instalação de bancos de dados e multiplicação de material genético e um grande número de pesquisas relacionadas (CHIN et al., 2016; EMBRAPA, 2019; SILVA; WIEST; CARVALHO, 2016).

Figura 5 - Variação da cor das pétalas de Hibisco.



Fonte: Do autor.

Trabalhos de análises fitoquímicas vêm sendo realizados, pois essas flores apresentam grande potencial nutricional, já que são de baixo valor calórico e podem ser utilizadas associadas nos tratamentos de obesidade, diabetes e as doenças crônicas degenerativas. Além disso, a obtenção de nutrientes essenciais com substâncias fitoquímicas podem ser consideradas como um estilo de vida saudável e apresentam um papel importante na prevenção de algumas doenças. Alguns estudos detectaram a presença de flavonoides, entre eles: gossipetina, hibiscitina e sabdaretina; riboflavinas, niacina e, ácido ascórbico, em diferentes partes do hibisco (CHIN et al., 2016; DA-COSTA-ROCHA et al., 2014; COSTA et al., 2015; MOJICA, 2012; SILVA; WIEST; CARVALHO, 2016).

2.2 Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários são intermediários e produtos de reações do metabolismo, e são restritos a pequenas moléculas. O termo secundário foi introduzido por Kossel em 1891, implica que os metabólitos primários estão presentes em todas as células e são de suma importância, já os metabólitos secundários são derivações e não fazem parte da base molecular dos organismos. A diferença entre eles é ambígua, mas sabe-se que ambos são muito importantes na parte estrutural das células e são considerados componentes de diferenciação adaptativa (THIRUMURUGAN, 2018).

As funções dos metabólitos secundários incluem: transporte de nutrientes, comunicação entre organismos, agentes reprodutores e muitas outras várias funções como antimicrobiana e antiparasitária, inibidores de algumas enzimas e imunossupressores. Além disso, garantem a continuidade do estado organizado (PEREIRA; CARDOSO, 2012; THIRUMURUGAN, 2018).

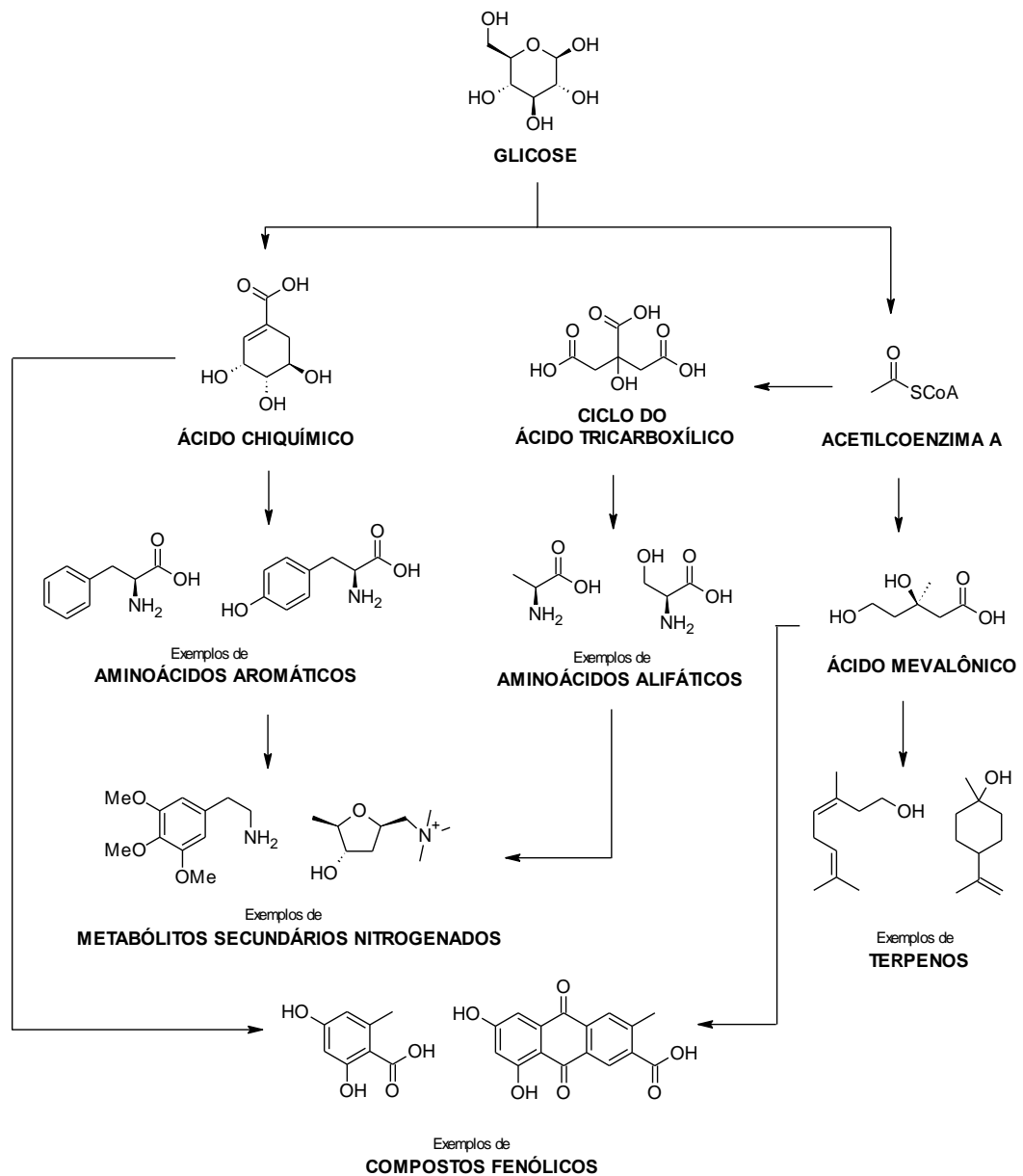
Os metabólitos secundários são obtidos a partir do ácido chiquímico e acetado, no metabolismo da glicose, como podem-se observar na Figura 6. Do ácido chiquímico derivam-se os alcaloides de aminoácidos aromáticos, cumarinas, taninos hidrolisáveis e fenilpropanoides, estes possuem um anel aromático em sua estrutura. Do acetato originam-se os esteroides, terpenoides, alcaloides alifáticos, ácidos graxos e triglicerídios. Alguns compostos obtidos no metabolismo da glicose, geram radicais livres, já outros possuem a função de combatê-los (ACHKAR et al., 2013; PEREIRA; CARDOSO, 2012; VIEIRA, 2013)

Os radicais livres são espécies químicas que contém um ou mais pares de elétrons livres na sua camada mais externa. São altamente instáveis, podem reagir com compostos que estiverem ao redor, se multiplicam facilmente e possuem uma vida curta. Podem ser impedidos de dois modos: com agentes antioxidantes endógenos ou exógenos ou por oxirredução, quando dois radicais se ligam (PEREIRA; CARDOSO, 2012; VIEIRA, 2013).

Os metabólitos secundários se destacam na área farmacêutica devido aos seus efeitos na saúde humana. São muito utilizados também nas áreas alimentícias, de perfumaria, agrônômica, entre outras, por possuírem uma marcante atividade biológica. As flores comestíveis possuem comprovadamente muitos metabólitos secundários com grande propriedade antioxidante, o que pode ser mais eficiente e barato para a indústria farmacêutica. Os metabólitos secundários com propriedades antioxidantes são de suma importância, uma vez que o organismo tenta a todo

instante se proteger do estresse oxidativo e acúmulos dos radicais livres, que geram danos celulares, inclusive ao próprio DNA, contribuindo para o envelhecimento e o aparecimento de diversas doenças (PEREIRA; CARDOSO, 2012; SILVA; WIEST; CARVALHO, 2016).

Figura 6 - Via de obtenção de metabólitos secundários.



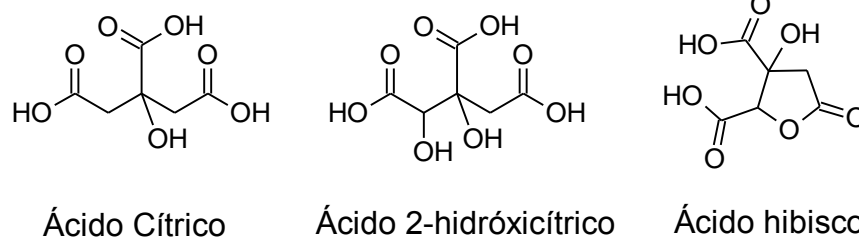
Fonte: (Silva, L., 2018).

2.3 Ácidos orgânicos

Em se tratando de suas características químicas, os ácidos orgânicos são formados por átomos de carbonos, e o maior grupo deles são os ácidos carboxílicos, possuindo o grupo funcional carboxila (COOH). São classificados como ácidos fracos em meio aquoso e com elevado ponto de ebulição. São amplamente usados na indústria de alimentos como aditivos, agentes de processamento, são adicionados para controlar a alcalinidade de muitos produtos podendo agir como tampões ou simplesmente como agentes neutralizantes. Como conservantes, podem atuar desde agentes antimicrobianos até antioxidantes. Em produtos de beleza podem ser utilizados como esfoliantes, provocando a descamação da pele e posterior renovação celular (ACHKAR et al., 2013; FIORUCCI; SOARES; CAVALHEIRO, 2002; SOLOMONS, 2015).

Em alguns estudos são relatados altos índices de ácidos orgânicos em extratos de *Hibiscus sabdariffa*, podendo ser encontrados até 24% de algum deles, a diferença entre as espécies, não alteram completamente as características entre si (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014). Em uma revisão bibliográfica, DA-COSTA-ROCHA, 2014 apresenta algumas moléculas de ácidos orgânicos presentes nas espécies de hibisco, e uma delas que é bem característica, que leva seu nome, como podemos ver a Figura 7.

Figura 7 - Ácidos orgânicos.



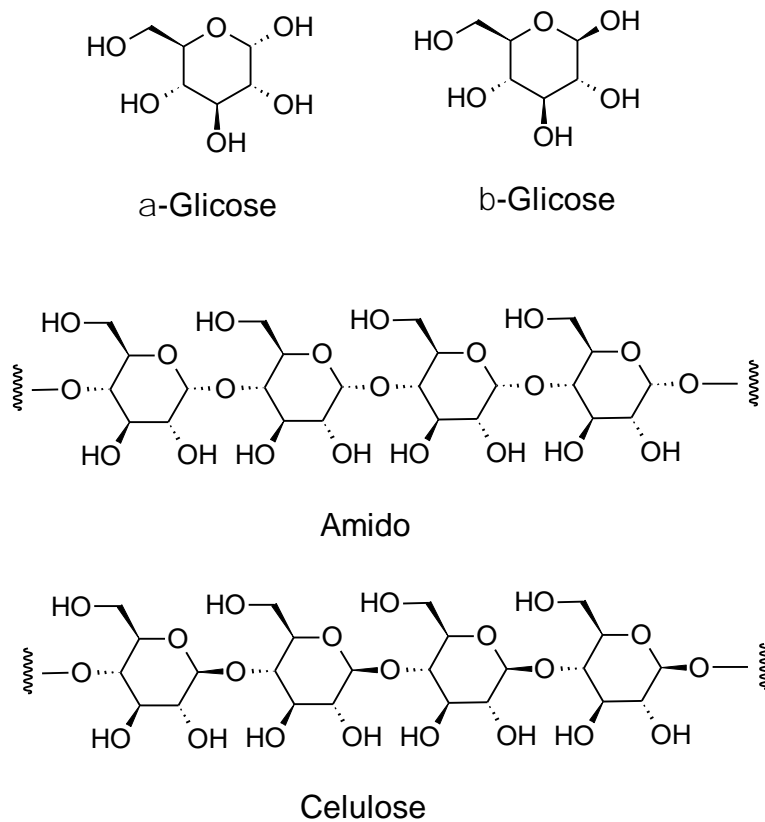
Fonte: Do autor.

2.4 Carboidratos

A glicose é a principal biomolécula energética. Nos vegetais é armazenada na forma de celulose e nos animais, na forma de glicogênio. Quando oxidada nas células gera energia na forma de ATP, utilizada para realização dos mais diversos trabalhos (NELSON; COX, 2014).

Em muitos estudos é relatado altos índices de carboidratos nas plantas, em especial as espécies de hibisco, que podem variar entre 10% a 65% nos extratos, a quantidade pode oscilar de acordo com a espécie e a origem da planta e seu cultivo, bem como a parte que está sendo analisada (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014). Alguns monômeros de açúcares ainda podem se interligar em moléculas maiores, como pode-se observar na Figuras 8, estes estão presentes nas plantas de forma geral.

Figura 8 - Moléculas de glicose, lactose, sacarose e outros polissacarídeos.



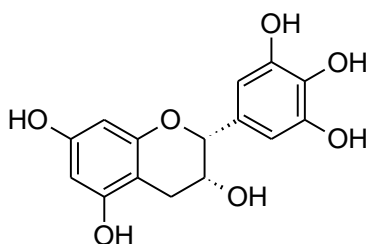
Fonte: Do autor.

2.5 Catequinas

As catequinas são flavonoides, podendo ser considerados taninos do tipo condensado, quando ligadas a mais moléculas dela mesma. São consideradas bons antioxidantes devido à presença dos fenóis em sua cadeia, que podem perder hidrogênios facilmente. As catequinas quando em presença de radicais livres no organismo, logo reagem com eles, evitando assim que

as células sadias possam ser oxidadas. Dessa forma, quanto mais moléculas interligadas, formando os taninos, mais radicais livres eles podem combater, aumentando ainda mais o seu poder de ação (DE SÁ; TURELLA, 2010; UETA et al., 2014).

Figura 9 – Epigalocatequina.



Fonte: Do autor.

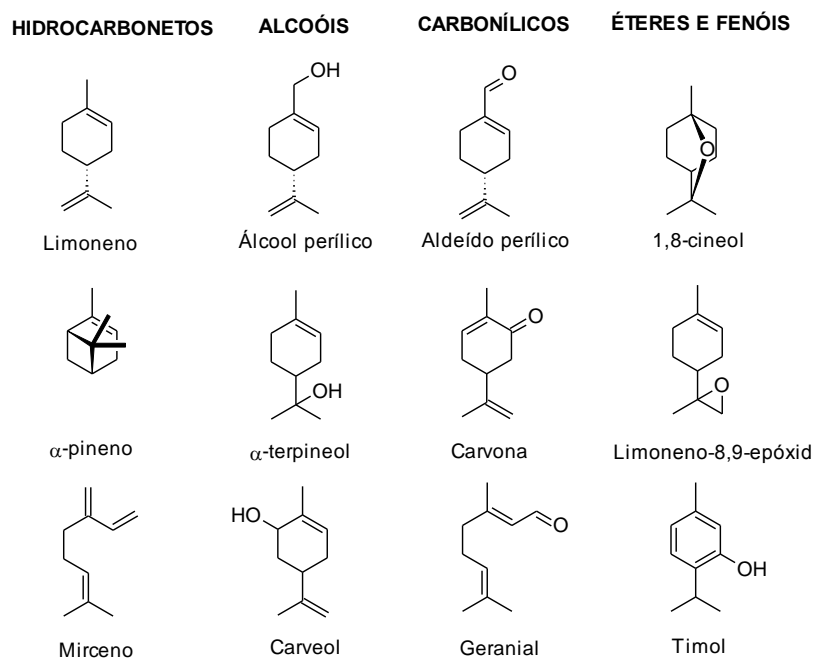
Há também estudos que associam as catequinas com atividade anticarcinogênica após testes em ratos, *in vivo* e *in vitro*, devido aos seus compostos fenólicos, que podem atuar como agentes inibidores e bloqueadores dos radicais livres. As referências em questão estudam vários tipos de chás vendidos no Brasil (MATSUBARA; RODRIGUEZ-AMAYA, 2006) e apresentam uma revisão bibliográfica de compostos alimentares que apresentam muitos benefícios à saúde de modo geral, com enfoque na prevenção de doenças (KUSANO et al., 2002).

2.6 Esteroides e terpenoides

Os esteroides e terpenos são metabólitos secundários derivados do acetato, que é transformado em um isopreno ativo, a unidade básica da composição dos terpenos. Os esteroides de origem vegetal possuem 28 ou 29 carbonos, sua nomenclatura varia conforme a quantidade de carbonos e unidades isoprênicas, algumas estruturas podem ser observadas na Figura 10. Com exceção o colesterol que possui 27 e ramificações, desde os anos 50 vem sendo estudados pelo efeito de redução da colesterolemia, redução do risco de doenças cardiovasculares e alguns tipos de tumores. Os terpenoides advêm de uma diversa família de produtos naturais e sua origem bioquímica provém de unidades de isopreno. Plantas com derivados terpênicos são muito utilizadas como ansiolítico, anticonvulsivante e antinociceptivo

(QUEIROZ et al., 2009; PASSOS et al., 2009; PEREIRA; CARDOSO, 2012; SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

Figura 10 - Terpenos.



Fonte: Do autor.

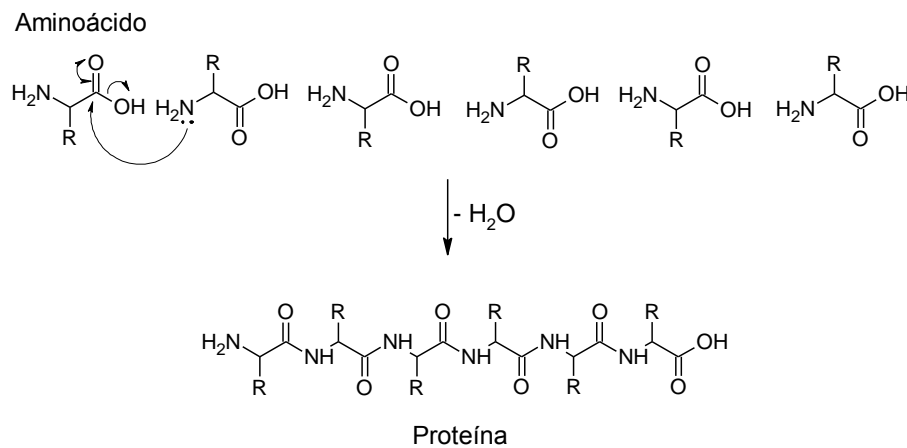
A principal atividade dos terpenos são relativos à reatividade do carbocátion e a grande possibilidade de fazer reações de adição ou eliminação (QUEIROZ et al, 2009). Em sua revisão bibliográfica, PASSOS et al., 2009 apresentaram diversos estudos correlacionando a ação dos triterpenóides, presentes em diversas plantas diferentes que possuíam a classe, como sedativo, analgésico, tranquilizante e até protetor de neurônios corticais.

Alguns terpenos e esteroides ainda podem desenvolver uma atividade antimicrobiana (GRANATO et al., 2013), antiulcerativa (QUEIROZ et al., 2009), vaso protetora, antisséptica e anti-irritante (LIMA et al., 1982; SOUZA, 2011). Estão presentes em frutas cítricas, no ginseng, *Centela asiática*, cannabis, manacá, dentre outras flores e folhas (KUSANO et al., 2002; PASSOS et al., 2009; PEREIRA; CARDOSO, 2012; QUEIROZ et al., 2009).

2.7 Proteínas e Aminoácidos

As proteínas são condensados de aminoácidos, como podemos observar na Figura 11, são estruturas complexas e fazem parte do esquema estrutural das plantas. Podem ser complexadas por polifenóis deixando de estar acessíveis às proteases, ou os polifenóis podem inibir as enzimas que metabolizam as proteínas. Já as proteínas salivares podem complexar facilmente com taninos, diminuindo o efeito negativo de alguns deles na dieta (CARVALHO, 2007).

Figura 11 - Esquema de formação de proteínas.



Fonte: Do autor.

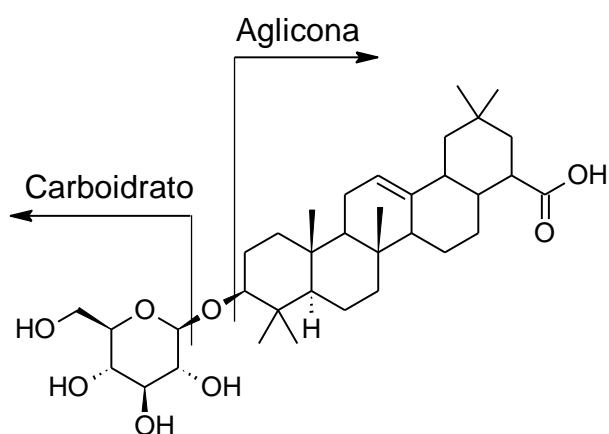
Alguns estudos apresentam que extratos de hibiscos frescos podem conter 1,9g de proteínas em cada 100g de flor, ou em suas sementes, podem conter até 27% da sua massa e nas folhas, podem conter até 3,3 g de proteínas em 100g. Esses valores foram inferidos por alguns autores, e podem ser alterados de acordo com a região de plantio e variedade de hibisco (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014).

2.8 Saponinas

As saponinas são substâncias derivadas do metabolismo secundário das plantas. São normalmente encontradas nos tecidos mais vulneráveis ao ataque fúngico, bacteriano ou predatório dos insetos, sendo consideradas parte do sistema de defesa das plantas e indicadas como “fitoprotetoras”. Essa atividade pode estar relacionada com a interação com os esteróis da membrana (CASTEJON, 2011).

São semelhantes aos glicosídeos por possuírem uma molécula de açúcar e uma aglicona em sua composição, conforme Figura 12. Possuem características surfactantes e de saponificar substâncias lipossolúveis por diminuírem a tensão superficial da água, provocando o aparecimento de espuma e apresentam propriedades tensoativas. Podem ser classificadas, devido a serem básicas, ácidas ou neutras e a sua parte açucarada, em saponinas triterpênicas e saponinas esteroidais (PEREIRA; CARDOSO, 2012; SOUZA, 2011).

Figura 12 - Esquema geral de uma saponina.



Fonte: Do autor.

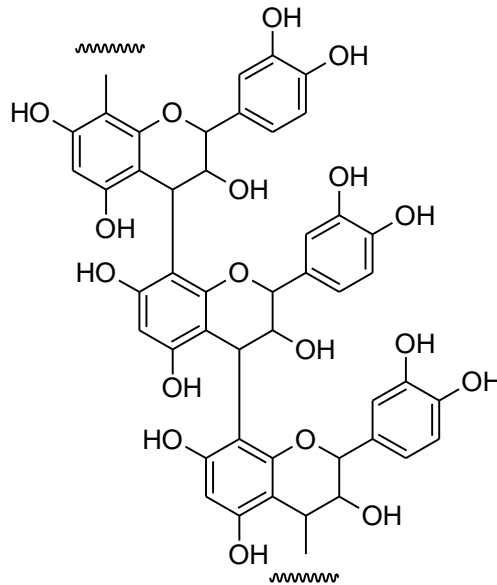
Podem ser encontradas principalmente na soja e outras leguminosas, beterraba, espinafre, açafraão, amendoim e folhas de chás. Possuem efeito antioxidante, são citotóxicas contra células tumorais, nas plantas regulam seu crescimento, apresentam defesa contra insetos e outros patógenos, (PEREIRA; CARDOSO, 2012). Saponinas triterpênicas do ginseng demonstram efeitos benéficos em atividades do sistema nervoso central, com a considerável melhora no aprendizado e memória, além da redução dos processos de morte de neurônios em casos de isquemia (PASSOS et al., 2009).

2.9 Taninos

Taninos são compostos polifenólicos com alto peso molecular, eles podem precipitar proteínas e ser identificados pelo caráter adstringente. São classificados em hidrolisáveis, quando puderem ser degradados por hidrólise química ou enzimática e por condensados, quando suas estruturas possuírem unidades de flavan-3-ol, como exemplifica a Figura 13 e, ao

serem aquecidos em meio ácido, originarem antocianidinas (CARVALHO, 2007; PINTO et al., 2004).

Figura 13 - Estrutura geral de um tanino.



Fonte: Do autor.

Os taninos possuem a capacidade de reagir com proteínas e, conseqüente função de inibição em algumas reações enzimáticas, tornando-as inativas e em alguns casos não fazendo o transporte de nutrientes para células ou bactérias presentes no organismo (DE SÁ; TURELLA, 2010; UETA et al., 2014).

Os taninos na produção animal não são totalmente agradáveis, são tidos como antinutricionais, podendo levar à perda de peso, tornando os alimentos menos digestíveis por inibirem enzimas ou se ligarem a compostos presentes na alimentação, em alguns casos podendo causar úlceras. Mas nem todos os taninos são ruins, outros podem aumentar a digestibilidade de proteínas, eliminar parasitas e diminuir timpanismo espumoso (CARVALHO, 2007). Na área de fitocosmética, são bastante importantes pelas propriedades protetoras, cicatrizante, antisséptica e antioxidante (SOUZA, 2011).

2.10 Otimização e determinação de compostos fitoquímicos

Alguns estudos recentes possuem o enfoque na otimização da extração de alguns compostos específicos, portanto, pode-se associar estes melhoramentos de análises também para o presente trabalho. É usual encontrar diversas pesquisas utilizando extratos aquosos quando nos referimos às plantas, mas ao mesmo tempo sabemos que algumas classes de substâncias são extraídas mais facilmente em outros solventes.

VIZZOTTO; PEREIRA, 2011 experimentaram cinco solventes para posterior comparação dos testes com enfoque nos compostos fenólicos, dois deles também utilizados na presente pesquisa. As matérias primas foram preparadas identicamente, para que não houvesse divergência nos extratos, nem mesmo perda da atividade antioxidante no processo de extração e maceração. Ao final, foi observada uma significativa alteração nas concentrações totais de compostos fenólicos, mas não houve grande divergência nas atividades antioxidantes encontradas.

3 OBJETIVO

Frente ao apresentado, o objetivo desse trabalho é identificar, pela da triagem fitoquímica, a presença de importantes classes de metabólitos secundários nos diferentes extratos de hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis L*). Espera-se, com isso, fomentar a continuação das pesquisas iniciadas no DQI/UFLA a respeito da elucidação sobre o efeito emagrecedor e antidiabético do hibisco, relacionando-o a inibição da α -glicosidase. E também, propor uma rota dos mecanismos de identificação das classes de metabólitos, uma vez que esses não são bem elucidados na literatura.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do material vegetal

As amostras utilizadas para as análises fitoquímicas foram coletadas no campus da Universidade Federal de Lavras (-21.225454, -44.972710), entre os anos de 2016 e 2017. A exsicata foi coletada, e devidamente preparada para posterior identificação da espécie pelo Herbário da ESAL, que identificou a espécie como *Hibiscus rosa-sinensis L.*

As flores foram coletadas no período da manhã em todos os dias de coleta, para que não houvesse alteração nas condições ambientais em sua composição, e também sem a iminência de chuva. Posteriormente estas foram limpas e secas em estufa à 40°C. Após cinco dias na estufa, as flores foram armazenadas em sacos plásticos limpos, com envelopes de sílica, para evitar que elas reabsorvessem alguma umidade, e não corressem o risco de proliferação de fungos.

4.2 Obtenção dos extratos

Para o preparo dos extratos, foram pesados aproximadamente 70 g de amostra seca na qual foi adicionado o volume de 500 mL dos solventes extratores acetato de etila, metanol e hexano. Após a adição, a mistura foi deixada em contato por 12 horas. Após esse tempo, houve absorção de parte do solvente no caso do metanol e hexano. Dessa forma, uma quantidade a mais de solvente foi adicionada nesses para dar início a próxima etapa de refluxo. Essas informações estão dispostas na Tabela 1.

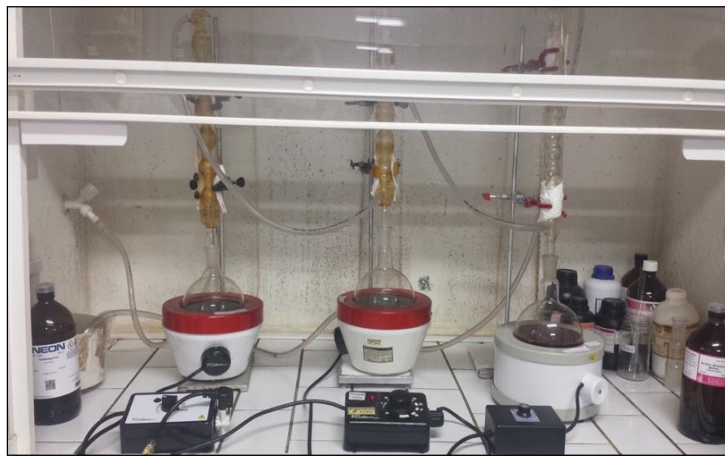
Tabela 1 - Relação entre massa de flor e volume adicionado de solvente.

Solvente	Massa de flor seca (g)	Volume inicial de solvente (mL)	Volume total de solvente utilizado (mL)
Acetato de etila	70,11	500	500
Metanol	69,88	500	670
Hexano	70,30	500	550

Fonte: Do autor.

Um sistema de refluxo, Figura 14, foi preparado e permaneceu em funcionamento por 10 horas. O extrato metanólico entrou em ebulição de forma vigorosa havendo leve perda de solvente, essa quantidade perdida foi repostada e o sistema foi mantido em funcionamento por 4 horas além dos demais.

Figura 14 - Imagem do sistema de refluxo utilizado para realização dos extratos.



Fonte: Do autor.

Após a filtração dos extratos, os mesmos foram deixados na capela de exaustão de gases para que evaporação do solvente, de acordo com a Figura 15. Após essa etapa, os extratos foram submetidos à triagem fitoquímica.

Figura 15 - Extratos após filtração.



Fonte: Do autor.

4.3 Triagem fitoquímica dos extratos vegetais

4.3.1 Ácidos orgânicos

Uma ponta de espátula do material seco foi diluído em 3 mL de água destilada e então, foram adicionados de 3 a 5 gotas do reativo de Pascová. Como a solução contendo o extrato descorou as gotas do reativo de Pascová, isso indica reação positiva.

4.3.2 Carboidratos (Reação de Molish)

Uma ponta de espátula do material seco foi diluído em 2 mL de água e então foram adicionadas gotas de uma solução alcoólica de naftol. Em seguida, cuidadosamente, pelas paredes do tubo de ensaio, foram adicionados 3 mL de ácido sulfúrico concentrado (procedimento realizado em capela de exaustão de gases).

Obs.: Formação de anel violáceo no contato entre as duas camadas indica reação positiva.

4.3.3 Polissacarídeos

Uma ponta de espátula do material seco foi diluído em 5 mL de água destilada e foram adicionados 2 gotas de lugol.

Obs.: Coloração azul indica reação positiva.

4.3.4 Aminoácidos (Reação de Ninhidrina)

Uma ponta de espátula do material seco foi diluído em água destilada, e então foi adicionado 0,5 mL de solução aquosa de ninhidrina 1%. A mistura foi aquecida até a ebulição.

Obs.: Uma coloração violeta persistente indica reação positiva.

4.3.5 Taninos

Uma ponta de espátula do material seco foi diluído em 10 mL de água destilada, e então foi acrescido de 1 gota de cloreto férrico a 1%.

Obs.: Mudança de coloração ou formação de precipitado indica reação positiva.

4.3.6 Catequinas

Uma ponta de espátula do material seco foi diluído em 3 mL de metanol, e então foram adicionados 1 mL de solução aquosa de vanilina a 1% e 1 mL de ácido clorídrico concentrado (procedimento realizado em capela de exaustão de gases).

Obs.: O surgimento de uma coloração vermelha intensa indica reação positiva.

4.3.7 Derivados de benzoquinonas, naftoquinonas e fenantraquinonas

Em um tubo de ensaio grande, uma ponta de espátula do material seco foi diluído em 3 mL de metanol. Foram adicionados duas goras de carbonato de sódio (25%), duas gotas de formaldeído (4%) e duas gotas de alfa-dinitrobenzeno (5%). A mistura foi aquecida em banho-maria.

Obs.: Uma coloração violeta indica reação positiva.

4.3.8 Flavonoides

Uma ponta de espátula do material seco foi diluído em 10 mL de metanol, e então foram adicionados 5 gotas de ácido clorídrico concentrado (procedimento realizado em capela de exaustão de gases) e 1 cm de fita de magnésio.

Obs.: O surgimento de uma coloração rósea na solução indica reação positiva.

4.3.9 Glicosídeos cardíacos

Uma ponta de espátula do material seco foi diluído em 4 mL de metanol e dividido em duas porções. Em cada uma delas foram adicionadas gotas dos seguintes reagentes:

a) Reativo de Kedde

Obs.: Coloração azul ou violeta indica reação positiva.

b) Nitroprussianato de sódio a 5 % em água e hidróxido de sódio 2 M

Obs.: Coloração roxa intensa indica reação positiva.

4.3.10 Esteroides e triterpenoides

Uma ponta de espátula do material seco foi diluído em 3 mL de clorofórmio e então foram adicionados 2 mL de anidrido acético, agitando suavemente. Pelas paredes do tubo, foram adicionados 1 mL de ácido sulfúrico concentrado (procedimento realizado em capela de exaustão de gases).

Obs.: No caso de reação positiva, observa-se uma sucessão de cores, do azul evanescente ao verde persistente.

4.3.11 Depsídeos e depsidonas

Uma ponta de espátula do material seco foi diluído em 5 mL de éter etílico em um tubo de ensaio grande. O éter foi evaporado em banho-maria e então, foram adicionados 3 mL de metanol e 3 gotas de cloreto férrico a 1%, seguido de agitação constante.

Obs.: Cloração verde, azul ou cinza indica reação positiva.

4.3.12 Derivados de cumarina

Uma ponta de espátula do material seco foi diluído em 5 mL de éter etílico, utilizando um tubo de ensaio grande. A solução foi concentrada em banho-maria até aproximadamente

0,5 mL. Em papel de filtro, foram aplicadas de 3 a 5 gotas da solução éterea, de modo a formar duas manchas, e a uma delas foi adicionada uma gota de hidróxido de sódio a 1 M. Metade da mancha foi coberta com papel escuro e exposta à luz ultra-violeta.

Obs.: Fluorescência azul na parte exposta da mancha indica reação positiva.

4.3.13 Saponinas espumídicas

Em tubo de ensaio com tampa rosqueada, uma ponta de espátula do material seco foi diluído em 1 mL de etanol 80° GL e diluído até 15 mL com água destilada. O tubo foi fechado e agitado vigorosamente durante 5 minutos.

Obs.: Se a camada de espuma permanecer estável por mais de meia hora, o resultado é considerado positivo.

4.3.14 Alcaloides

Uma ponta de espátula do material seco foi diluído em 3 mL de ácido clorídrico a 5 % e dividido em três porções de 1 mL. Foram adicionadas de 3 a 5 gotas de cada um dos seguintes reagentes:

a) Bouchardat

Obs.: Precipitado laranja-avermelhado indica reação positiva.

b) Bertrand

Obs.: Precipitado branco indica reação positiva.

c) Dragendorff

Obs.: Precipitado vermelho-tijolo indica reação positiva.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Triagem fitoquímica dos extratos obtidos

As plantas, em geral, são muito influenciadas pelo meio externo, luz solar, solo, chuva, fertilizantes, poluição do ar entre outros fatores que podem ser de natureza biológica, física ou química. Há ainda as interações com outras plantas, insetos e adaptações coevolutivas num dado ecossistema (ALVES et al., 2010). Pensando nisso, as flores foram coletadas em dias com atividades naturais semelhantes, sendo elas no período matutino, em dia ensolarado, não havendo chuva no dia anterior e no mesmo local de plantio, de modo que o solo não se modificasse tanto.

Como as plantas sofrem muitas variações com influências externas, também deve extrair diferentes classes de substâncias, de acordo com o tipo de solvente e as formas de interações que podem ocorrer entre si. Portanto o uso de diferentes solventes é devido à possibilidade de variação de solubilidade dos compostos naturais em diferentes polaridades. Pode-se verificar a importância dessa forma de identificação, já que as cores em cada extrato se apresentaram bem distintas, podendo então existir a possibilidade de diferentes compostos orgânicos presentes em cada extrato. As Tabelas 2, 3 e 4 apresentam os testes realizados com seus respectivos resultados.

Tabela 2 - Prospecção fitoquímica das flores de Hibisco para extratos de metanol.

Testes realizados	Extrato de Metanol
Ácidos orgânicos	+
Carboidratos	+
Alcalóides	-
Catequinas	+
Depsídeos e Depsídonas	-
Derivados de Cumarina	-
Esteroides e Triterpenoides	-
Flavonoides	-
Glicosídeos Cardíacos	-

Polissacarídeos	-
Aminoácidos	-
Saponina Espumídica	+
Taninos	-
Lactonas	-

Legenda: (+) teste positivo; (-) teste negativo; (M) teste moderado/mascarado

Fonte: Do autor.

Tabela 3 - Prospecção fitoquímica das flores de Hibisco para extratos de acetato de etila.

Testes realizados	Extrato de Acetato de Etila
Ácidos orgânicos	M
Carboidratos	+
Alcalóides	-
Catequinas	-
Depsídeos e Depsionas	-
Derivados de Cumarina	-
Esteroides e Triterpenoides	+
Flavonoides	-
Glicosídeos Cardíacos	-
Polissacarídeos	-
Aminoácidos	-
Saponina Espumídica	+
Taninos	-
Lactonas	-

Legenda: (+) teste positivo; (-) teste negativo; (M) teste moderado/mascarado

Fonte: Do autor.

Tabela 4 - Prospecção fitoquímica das flores de Hibisco para extratos de hexano.

Testes realizados	Extrato de Hexano
Ácidos orgânicos	M
Carboidratos	-

Alcalóides	-
Catequinas	-
Depsídeos e Depsidas	-
Derivados de Cumarina	-
Esteroides e Triterpenoides	+
Flavonoides	-
Glicosídeos Cardíacos	-
Polissacarídeos	-
Aminoácidos	+
Saponina Espumílica	-
Taninos	-
Lactonas	-

Legenda: (+) teste positivo; (-) teste negativo; (M) teste moderado/mascarado

Fonte: Do autor.

Analisando os dados da Tabela 2, 3 e 4, podemos identificar que a diferença de polaridade dos solventes extraiu diferentes compostos orgânicos das flores do *Hibiscus rosa sinensis L.*, pois os tipos de interações polares ou apolares influenciam as propriedades físicas e também a reatividade das moléculas, já que elas podem conter átomos com diferentes valores de eletronegatividade e elétrons não compartilhados e, em moléculas orgânicas, outros compostos que fazem ligações com o carbono e hidrogênios são de extrema importância, já que ambos possuem eletronegatividades semelhantes (SOLOMONS, 2015).

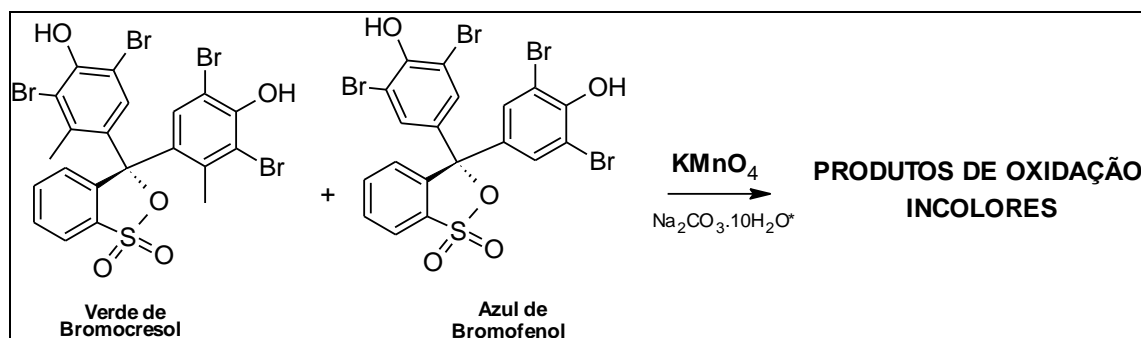
Essas regiões mais polares ou apolares das moléculas atraem positiva, ou negativamente outras moléculas, podendo dessa forma isolar determinados compostos mais facilmente, quando os extratos são submetidos ao sistema de refluxo. Essa análise é importante, já que em formulações farmacêuticas, utilizam-se as substâncias ativas isoladamente e, nas espécies vegetais, principalmente as medicinais, estão presentes várias substâncias diferentes, que podem ser extraídas de diferentes formas, para então serem utilizadas. Muitas vezes as pessoas utilizam as plantas medicinais em forma de chás, fazendo um extrato aquoso, mas os testes fitoquímicos mostram como a diferença de polaridade dos solventes pode extrair substâncias diferentes, e que podem ser melhor aproveitadas de forma isolada no organismo, já que estas plantas possuem o propósito terapêutico.

Os testes fitoquímicos, independente do extrato analisado, mostraram a presença de ácidos orgânicos, carboidratos, catequinas, esteróides e triterpenoides, proteínas e aminoácidos e saponinas na flor de *Hibiscus rosa sinensis L.*

5.2 Ácidos orgânicos

Após uma busca na literatura sobre como funciona o mecanismo deste teste analítico, no melhor do nosso conhecimento, não foram encontradas referências que explicassem a parte química deste experimento. Dessa forma, propõem-se neste trabalho uma possível explicação para como ele funciona. A Figura 16 mostra um esquema geral de como a reação funciona. Uma mistura de verde de bromocresol, azul de bromofenol, permanganato de potássio e carbonato de sódio deca-hidratado se torna incolor caso o extrato contenha ácido orgânicos.

Figura 16 - Reação positiva para o teste de ácidos orgânicos.



Fonte: Do autor.

Sabe-se que, em meio ácido, os compostos verde de bromocresol e azul de bromofenol apresentam coloração amarela resultante da abertura do sistema cíclico contendo o átomo de enxofre. A reação desses compostos, em meio ácido, com permanganato de sódio é o que, muito provavelmente, origina os produtos de oxidação incolores. Isso deve ser decorrente da oxidação nas hidroxilas fenólicas nos anéis aromáticos dessas estruturas.

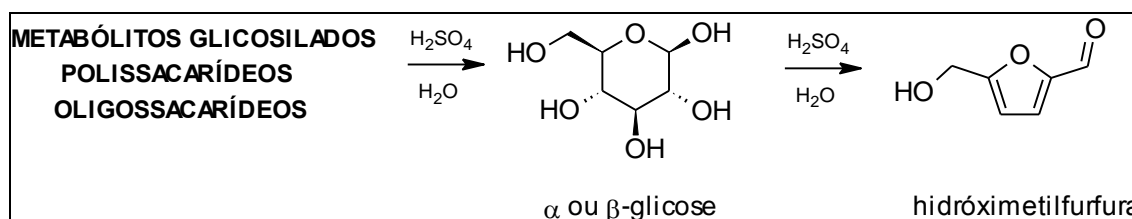
A mistura desses compostos com uma solução de carbonato de sódio, provavelmente, tem o objetivo de manter o pH da solução alto o que garante o sistema cíclico contendo o átomo de enxofre esteja fechado, mantendo a solução na coloração violeta intensa. Caso houvesse ácidos orgânicos no extrato, eles iriam reagir com os íons OH^- produzidos na hidrólise do sal

de carbonato, diminuindo o pH da solução e acelerando a reação que dá origem aos produtos de oxidação incolores.

5.3 Carboidratos

No teste de identificação de carboidratos existem indícios de que essa reação ocorre em duas etapas distintas. Em um primeiro momento, o ácido sulfúrico concentrado promove a desidratação e rearranjo no esqueleto do carboidrato para formar hidróximetilfurfural, se o carboidrato de origem for alfa ou beta glicose. A glicose pode estar livre no meio ou pode ser hidrolisada de metólitos que a contenham, além de poder se oriunda de polissacarídeos hidrolisados. Exemplificado na Figura 17.

Figura 17 - Reação de desidratação e rearranjo de carboidrato.

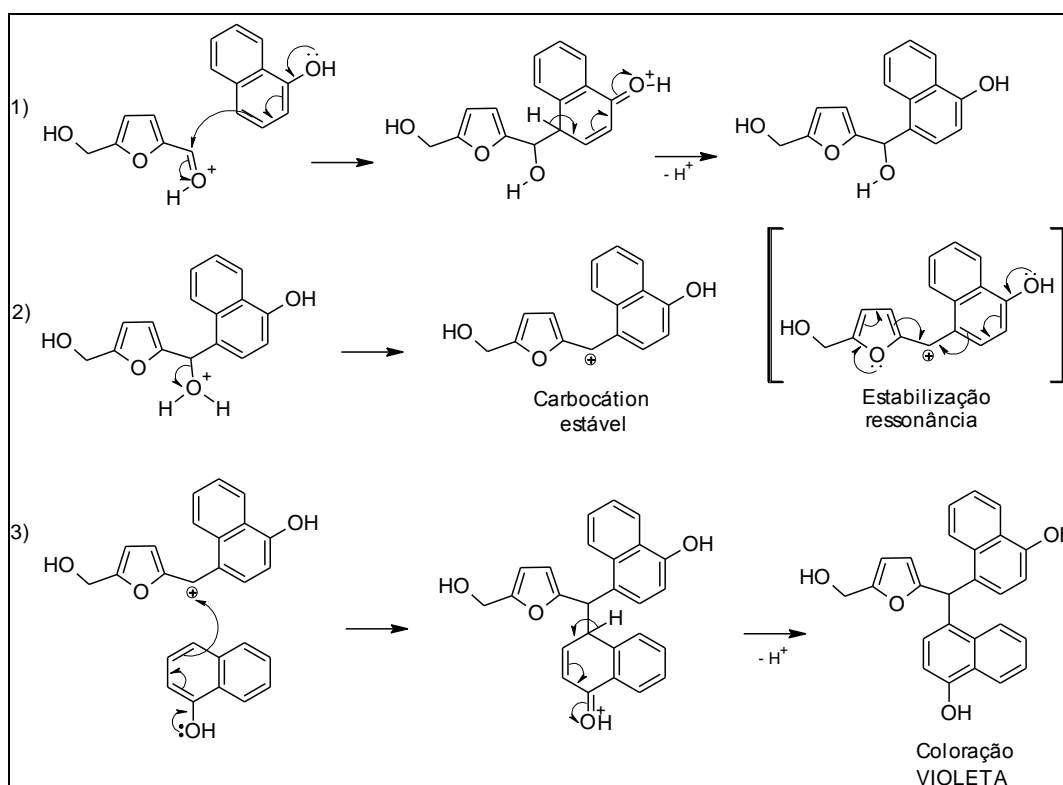


Fonte: Do autor.

O mecanismo de como essa reação ocorre provavelmente envolve a abertura do hemiacetal cíclico da unidade de glicose, promovida pelo meio ácido, de acordo com a etapa 1 da Figura 18. Em uma segunda etapa (etapa 2 – Figura 18) a hidroxila do carbono 5 da unidade de glicose deve promover uma S_N2 no carbono 2 dessa mesma cadeia carbônica, fechando um sistema cíclico de cinco membros. Reações desse tipo costumam ser favorecidas por causa da carbonila no carbono vizinho. Os orbitais antiligantes da carbonila e da ligação sigma C-O se combinam para formar um novo LUMO de menor energia e mais fácil de acessar (CAREY et al. 2007). O aumento da entropia através da produção de água deve também favorecer esse ataque nucleofílico. Por fim, na etapa 3 (Figura 18) a eliminação de água leva à formação do sistema aromático – o hidroximetilfurfural.

a saída dessa hidroxila de álcool na forma de água. Esse processo é favorável, pois o carbocátion formado pode se estabilizar com vários contribuintes de ressonância. Na terceira e última etapa (Figura 20) uma segunda molécula de alfa-naftol deve promover um ataque nucleofílico ao carbocátion formado na segunda etapa para dar origem ao produto final que dá a coloração violeta característica de teste positivo nesse experimento.

Figura 20 - Mecanismo da reação de condensação entre o aldeído e duas moléculas de alfa-naftol.

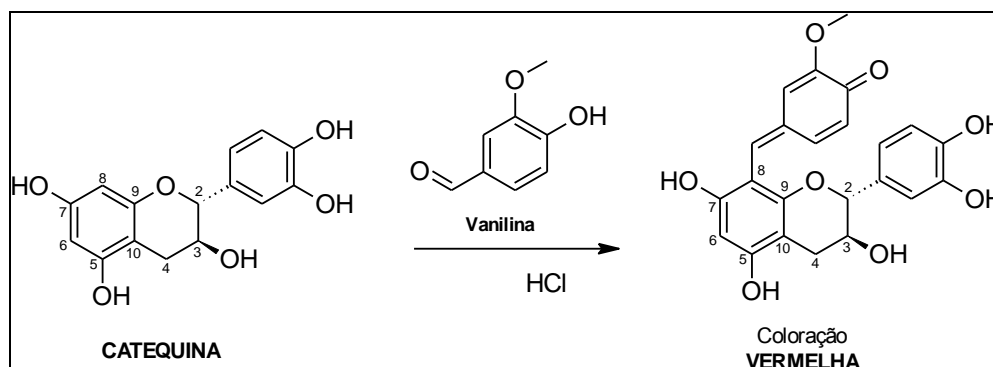


Fonte: Do autor.

5.4 Catequinas

O teste de identificação de catequinas consiste na adição de uma solução de vanilina em meio ácido ao extrato. A provável reação que justifica a coloração vermelha que aparece no caso de teste positivo envolve o acoplamento de uma molécula de catequina com uma molécula de vanilina para formar um sistema conjugado na molécula produto. O esquema geral dessa reação está apresentado na Figura 21.

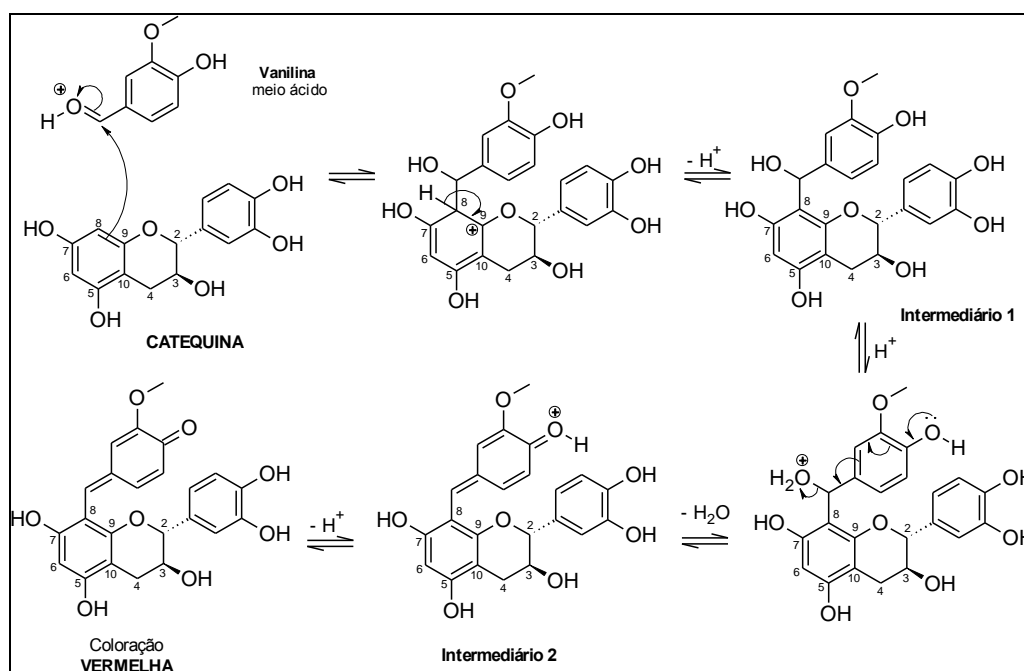
Figura 21 - Reação geral entre uma catequina e valina em meio ácido.



Fonte: Do autor.

Em meio ácido, a carbonila de aldeído do composto vanilina deve sofrer um ataque nucleofílico do carbono 8 de uma molécula de catequina. Essa reação é uma substituição eletrofílica aromática favorecida pelos átomos de oxigênio nas posições 5, 7 e 8 do anel aromático (Figura 22). O ataque à carbonila da vanilina leva à formação de um álcool identificado como intermediário 1 (Figura 22), que em meio ácido protona e, como água, torna-se um bom grupo abandonador. O carbocátion que fica pode ser estabilizado por ressonância, especialmente pela hidroxila fenólica em posição *para* no sistema. A desprotonação do intermediário 2 leva à formação do produto final com coloração vermelha.

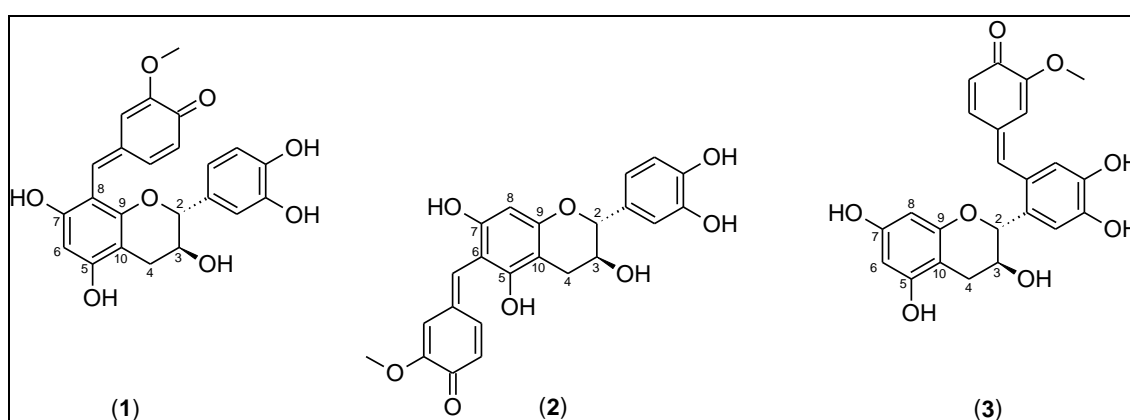
Figura 22 - Mecanismo de reação entre uma catequina e valina.



Fonte: Do autor.

O mecanismo discutido anteriormente abre uma discussão com relação à possibilidade de que outro carbono do anel aromático possa promover a reação, ou ainda, o anel aromático à direita na molécula de catequina possa promover o ataque. O resultado é que nesse caso, estruturas moleculares diferentes seriam obtidas. Na Figura 23 temos uma comparação entre o produto proposto no mecanismo (1), o produto da reação caso o carbono 6 reagisse (2) e uma possibilidade de produto com reação ocorrendo no anel aromático à direita (3).

Figura 23 - Outros possíveis produtos da reação.



Fonte: Do autor.

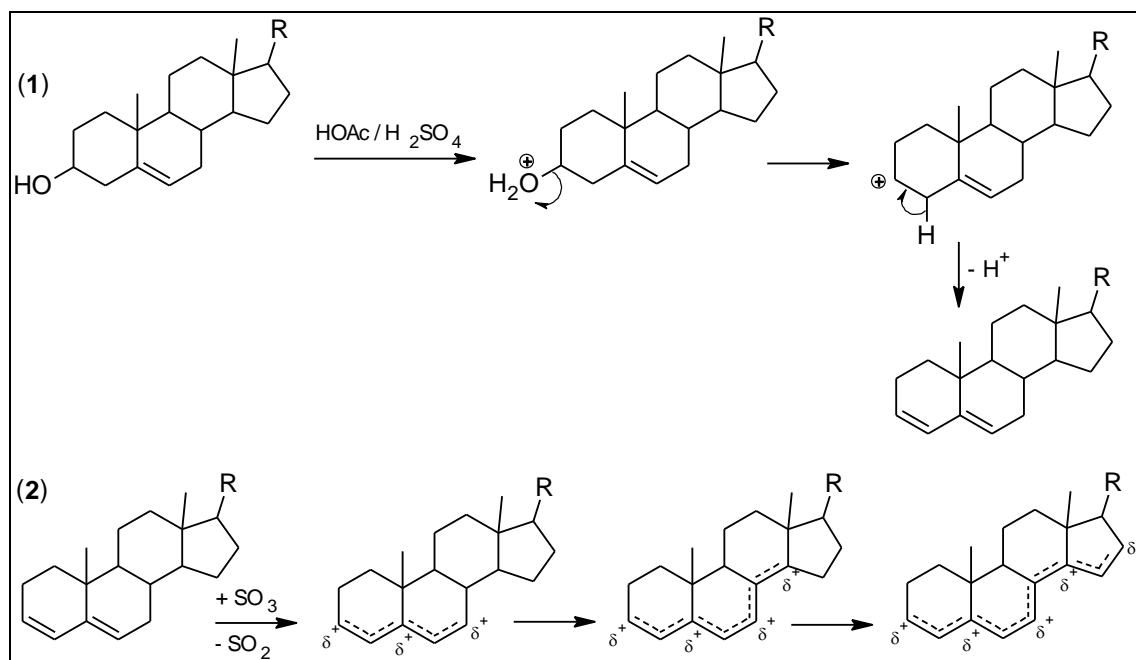
O produto (2) faz mais sentido do ponto de vista químico do que o produto (3) – Figura 23. Isso porque na molécula de catequina, o anel aromático à esquerda é mais rico em elétrons do que o anel aromático à direita, o que o torna mais reativo em uma reação de substituição eletrofílica aromática. Dentre as possibilidades de produtos (1) e (2), espera-se que o produto (1) apareça em maior quantidade pois o oxigênio da função éter (carbono 9) aumenta a densidade eletrônica mais efetivamente dos carbonos 8 e 10. Como o carbono 10 é impossibilitado de reagir, ela acaba ocorrendo no carbono 8.

Alguns estudos investigaram o efeito das catequinas do chá verde no metabolismo lipídico, no status antioxidante e no excesso de massa corporal em ratos durante a administração de uma dieta hiper energética por 7 semanas. A catequina com atividade mais estudada é a epigallocatequina, com sua estrutura demonstrada na Figura 9. Um dos grupos experimentais recebeu as catequinas na quarta semana de experimento e ao final do tratamento esse grupo apresentou diminuição na concentração de colesterol total, triglicerídeos, LDL (lipoproteína de baixa densidade) e de gordura visceral (LAMARRÃO; FIALHO, 2009).

5.5 Esteroides e terpenoides

Para o teste de esteroides e terpenoides, os extratos foram dissolvidos em clorofórmio e então foram adicionados 2 mL de anidrido acético com adição de ácido sulfúrico. Nesse experimento, o resultado positivo é evidenciado pela observação de uma sucessão de cores no tubo de ensaio. A explicação para a formação dessas cores, em caso de teste positivo, é que em meio ácido a hidroxila dos esteroides sofre protonação. Essa hidroxila sofre então uma eliminação originando uma ligação dupla de acordo com a etapa 1 do mecanismo proposto na Figura 24.

Figura 24 - Mecanismo de reação do teste para esteroides e terpenoides.



Fonte: Do autor.

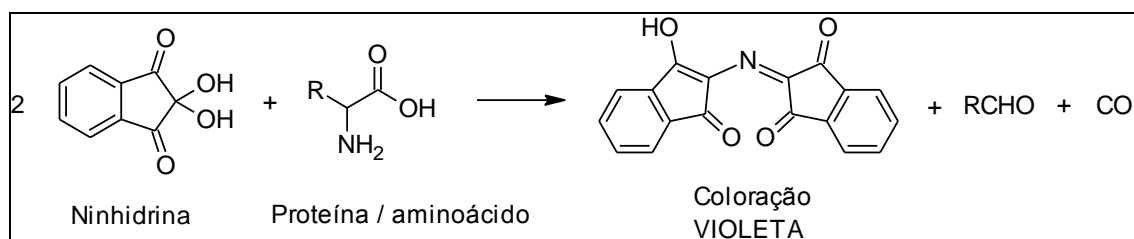
Na etapa 2 dessa reação (Figura 24) o meio ácido continua promovendo novas oxidações (vizinhas ao sistema conjugado) que seguem em novas reações de eliminação. Essas reações vão aumentando a extensão do sistema conjugado e variando em colorações de acordo com o número de ligações duplas carbono-carbono formada.

Para os extratos de flor de hibisco, apenas o extrato metanólico deu resultado negativo para este teste. Isso é esperado devido à baixa polaridade dessa classe de substâncias. Dessa forma, esses metabólitos foram encontrados apenas nos extratos de acetato de etila e hexano.

5.6 Aminoácidos.

A detecção de aminoácidos livres e proteínas, neste teste, ocorre devido à reação entre a ninhidrina e o aminoácido (ou resíduo de aminoácido contendo um grupo amina em uma proteína). Essa reação leva à formação de um aldeído (RCHO), à liberação de gás carbônico (CO₂) e à formação de um composto resultante do acoplamento de duas moléculas de ninhidrina com o nitrogênio do aminoácido detectado. Esse composto tem uma forte coloração violeta. O esquema geral de como essa reação acontece está apresentado na Figura 25.

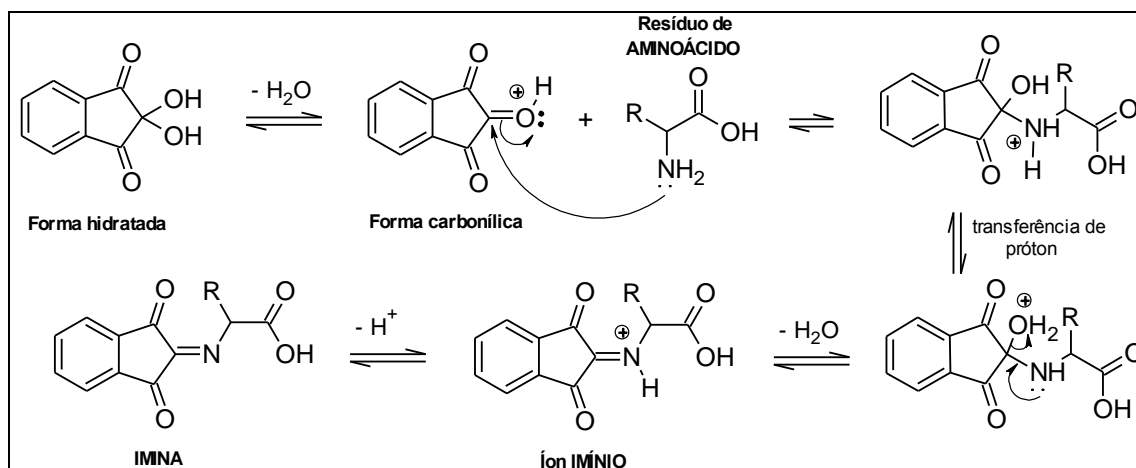
Figura 25 - Reação entre aminoácidos e ninhidrina.



Fonte: Do autor.

A literatura, de maneira geral, não é muito explícita ou foca muita atenção em como o mecanismo dessa reação acontece. Dessa forma, neste trabalho, sugere-se um mecanismo detalhado de como ocorre o acoplamento de duas moléculas de ninhidrina com o nitrogênio do aminoácido. Sabe-se que a molécula de ninhidrina em água está em equilíbrio entre sua forma hidratada e sua forma carbonílica. Essa carbonila central na molécula de ninhidrina é mais suscetível a ataques nucleofílicos do que as carbonilas vizinhas ao anel aromático. A ressonância com o anel benzênico diminui a eletrofilia delas. Dessa forma, origina-se uma imina entre a carbonila mais eletrofílica da ninhidrina e o grupamento amina livre (-NH₂) do aminoácido de acordo com a Figura 26.

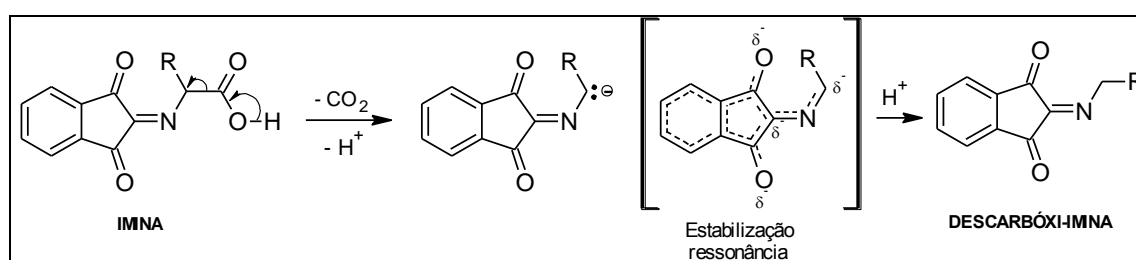
Figura 26 - Formação inicial de imina entre a ninhidrina e o aminoácido.



Fonte: Do autor.

Uma vez formado o intermediário imina, neste momento pode ocorrer a descarboxilação nessa estrutura. Isso é possível porque, uma vez liberada a unidade de gás carbônico, o par de elétrons resultante da quebra da ligação carbono-carbono pode ser estabilizado por ressonância em todo o sistema conjugado. Ao final, a protonação da estrutura leva à formação do intermediário agora chamado de descarbóxi-imina. Esse mecanismo está detalhado na Figura 27.

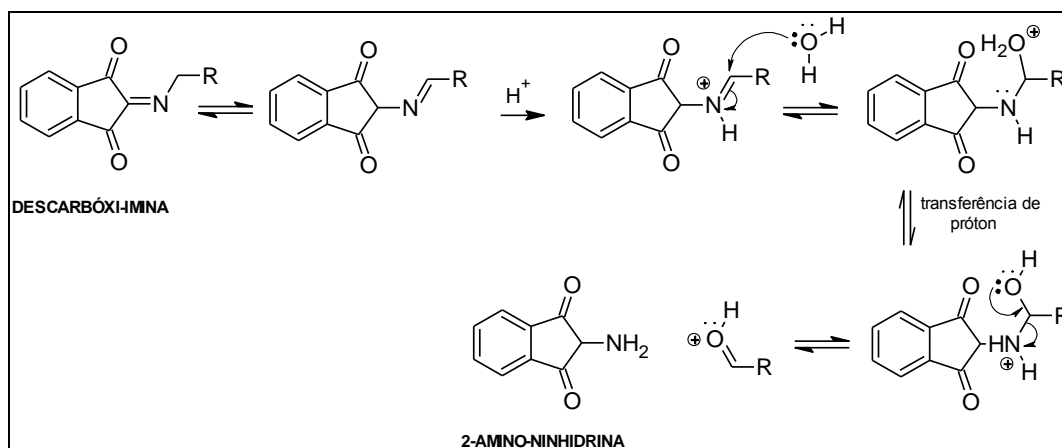
Figura 27 - Descarboxilação do aminoácido conectado à ninhidrina.



Fonte: Do autor.

Uma vez formado o intermediário descarbóxi-imina, este pode sofrer uma reorganização estrutural, trocando o grupamento imina que estava posicionado com o carbono da ninhidrina para uma imina com o carbono do aminoácido que sofreu a descarboxilação. Na próxima etapa, se essa nova imina sofrer uma hidrólise aquosa, será produzido a molécula de aldeído e o composto, arbitrariamente chamado de, 2-amino-ninhidrina. O mecanismo descrito pode ser visualizado na Figura 28.

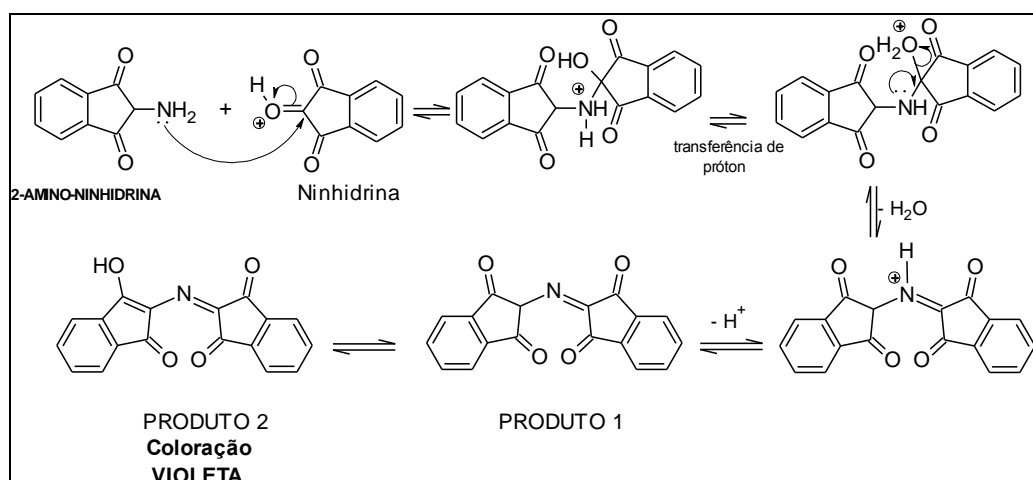
Figura 28 - Liberação da unidade de aldeído a partir do intermediário descarbóxi-imina.



Fonte: Do autor.

Na etapa final desse mecanismo, mais uma reação de formação de imina ocorre entre o grupamento amina ($-\text{NH}_2$) do intermediário 2-amino-ninhidrina, com uma molécula de ninhidrina. Ao final da reação, tem-se o produto 1 (Figura 29). Provavelmente o produto 1 deve ter seu equilíbrio ceto-enólico deslocado para a forma enólica preferencialmente (produto 2 – Figura 29), uma vez que a enolização do sistema significa formar um grande sistema conjugado. O produto 2 dá à solução a coloração violeta característica de reação positiva nesse teste analítico.

Figura 29 - Acoplamento do intermediário 2-amino-ninhidrina com uma segunda molécula de ninhidrina.



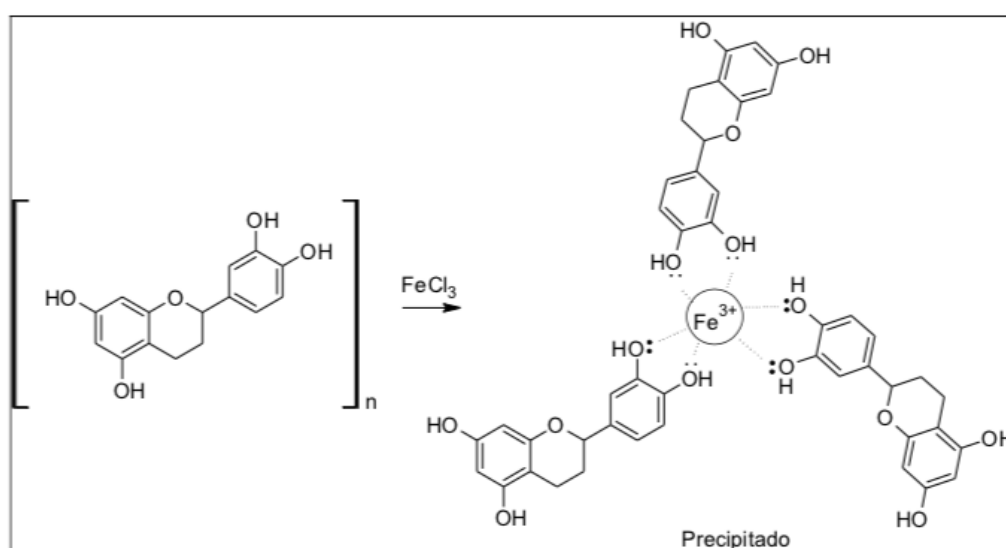
Fonte: Do autor.

Suas unidades monoméricas e seus produtos de hidrólise (aminoácidos e peptídeos), possuem ação eficaz na manutenção da hidratação do tecido cutâneo. As alterações de posição dos aminoácidos nas cadeias peptídicas geram diferentes propriedades físico-químicas, mesmo que estejam presentes os mesmos tipos de aminoácidos essenciais (SOUZA, 2011).

5.7 Taninos

O teste para detecção de taninos forneceu um resultado inicialmente negativo para os extratos, entretanto em algumas referências os autores citam a presença dessa classe, e posteriormente o teste foi refeito gerando um resultado positivo. Não existe um consenso na literatura de como esse teste funciona. A maioria das propostas concorda que o íon de Fe^{3+} deve promover a formação de um complexo colorido que indica o resultado positivo do teste, de acordo com o esquema apresentado na Figura 30.

Figura 30 - Mecanismo da reação de complexação com Fe^{3+}

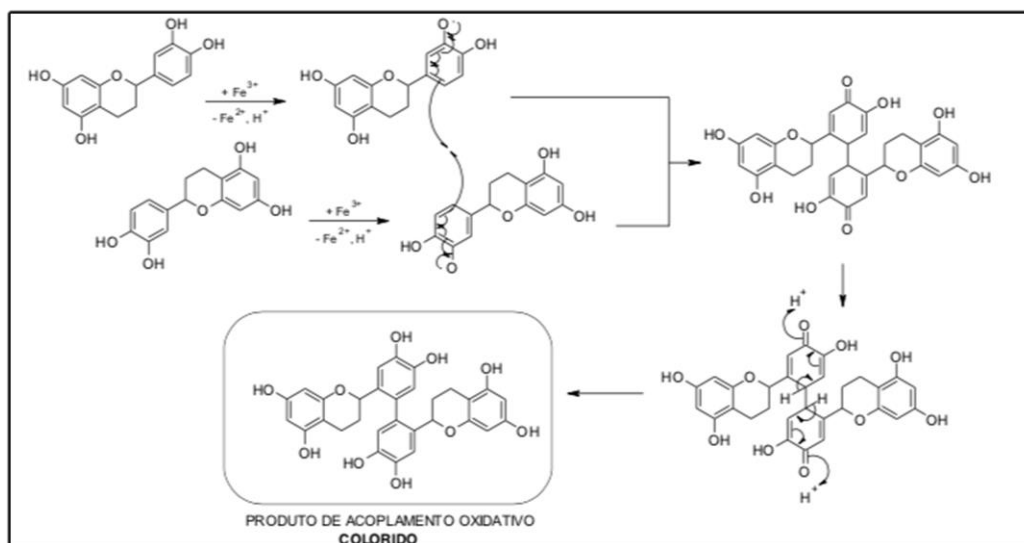


Fonte: Do autor.

Embora a proposta de formação de complexo seja coerente, uma outra possibilidade que pode ser levantada remete à reação de acoplamento oxidativo em síntese orgânica, normalmente feita com íons em Fe^{3+} e compostos fenólicos. Os íons de Fe^{3+} se reduzem à Fe^{2+} a partir da quebra das ligações $-\text{OH}$ de grupos fenólicos. O radical formado no oxigênio pode se estabilizar por ressonância no anel aromático. Se dois radicais orgânicos se chocam, a chance de uma ligação carbono-carbono ser formada é muito alta devido a alta energia de ligação. Esses

compostos resultantes de acoplamento oxidativo entre compostos fenólicos costumam apresentar coloração acentuada devido ao aumento da extensão do sistema conjugado. Esse mecanismo proposto está apresentado na Figura 31.

Figura 31 - Mecanismo da reação de acoplamento oxidativo induzida por Fe^{3+}



Fonte: Do autor.

5.8 Saponinas

Para este teste, o extrato foi dissolvido em etanol 80° GL e posteriormente diluído em água destilada. A solução foi vigorosamente agitada. Formou-se uma camada de espuma, a qual permaneceu estável por mais de meia hora, caracterizando a presença de saponinas, como é mostrado na Figura 32.

Figura 32 - Espuma formada no teste de saponinas.



Fonte: (Silva, L., 2018)

As saponinas apresentam parte de sua estrutura lipofílica e outra hidrofílica. Por esta característica são capazes de diminuir a tensão superficial da água e formar espuma quando submetidas à agitação (DEWICK, 2002).

Os biossurfactantes derivados de saponinas estão se mostrando excelentes estabilizadores de espuma e emulsificantes, além de apresentarem uma série de propriedades biológicas, algumas pesquisas mostram o interesse de seu estudo e suas aplicações na indústria farmacêutica e alimentícia (GOLEMANOV et al, 2012; BOUYER et al, 2012).

6 CONCLUSÃO

Os diferentes extratos obtidos mostraram que a polaridade de cada solvente pode extrair diferentes compostos químicos de acordo com a afinidade de cada molécula e suas respectivas interações. Dessa forma, é possível comparar cada classe obtida com sua respectiva atividade no metabolismo humano.

Os testes fitoquímicos, em cada extrato analisado, revelaram a presença de ácidos orgânicos, carboidratos, catequinas, esteroides e triterpenoides, proteínas e aminoácidos, taninos e saponinas na flor de *Hibiscus rosa sinensis L.*

As reações de identificação de cada classe de metabólitos secundários foram discutidas e seus mecanismos propostos e ponderadas, concebendo uma contribuição para futuras pesquisas que utilizarem os mesmos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHKAR, M. T. et al. Ácidos Orgânicos Constitutivos de las Resinas Glicosídicas de Tres Especies de Ipomoea (Convolvulaceae). **Quimica Nova**, v. 26, n. 2, p. 1182–1188, 2013.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária — ANVISA. Resolução RDC nº 18, de 03 de abril de 2013. Dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). **Diário Oficial da União**. 5 abr 2013; Seção 1:67.

ALVES, H. M. **A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos**. Caderno temático de Química, Nova na Escola, São Paulo, n 3, Março 2001.

ALVES, M. S. M. et al. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt. Bignoniaceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 2, p. 215–221, 2010.

BERA, A.; ALMEIDA-MURADIAN, L. B. DE. Propriedades físico-químicas de amostras comerciais de mel com própolis do estado de São Paulo. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 49–52, 2007.

BOUYER, E.; MEKHLOUFI, G.; ROSILIO, V.; GROSSIORD, J. L.; AGNELY, F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 436, p. 359-378, 2012.

CARAMEZ, R. R. B., Caracterização físico-química e estudo de estabilidade das antocianinas do cálice de *Hibiscus sabdariffa L.*, Dissertação de mestrado, UFSC, Florianópolis, 1999.

CARVALHO, E. B. Estudos da interação entre proteínas e taninos: Influência da presença de polissacarídeos, Faculdade de Ciências da Universidade do Porto, 2007.

CASTEJON, F. V. Taninos e Saponinas. Universidade Federal de Goiânia, Goiânia, 2011.

CAVALINI, M. Serviço de informações sobre plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos. **Extensio - Revista Eletrônica de Extensão**, v. 2, n. 2, p. 1–11, 2005.

CHIN, K. et al. Biological Characteristics , Nutritional and Medicinal Value of Roselle

, *Hibiscus sabdariffa*. **Agricultural Research and Extension Center**, v. 70813, n. MARCH 2005, p. 603–604, 2016.

COSTA, B. L. B.; SANTOS, R. O.; TEIXEIRA, I. N.; PEREIRA, L. L. S.; Chá de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) como auxiliar no tratamento da obesidade e diabetes, XXVIII Congresso de Iniciação Científica da UFLA, Resumo 6303-8-5070, UFLA, 2015.

DA-COSTA-ROCHA, I. et al. Hibiscus sabdariffa L. - A phytochemical and pharmacological review. **Food Chemistry**, v. 165, p. 424–443, 2014.

DE SÁ, R. S.; TURELLA, T. K. ARTIGO CIENTÍFICO Os efeitos dos polifenóis: catequinas e flavonóides da. 2010.

Decreto no 5.813, de 22 de junho de 2006. Presidência da República, Casa Civil, http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2004-2006/2006/decreto/d5813.htm, acessado em Junho 2010.

EMBRAPA, Hortaliças em Revista, EMBRAPA, Ano VI, N. 22, Maio a Agosto de 2017, ISSN 2359 – 3172. Disponível em <
<https://www.embrapa.br/documents/1355126/2250572/ed22.pdf/59c6768c-62da-72a3-84c7-1d996101f1b6> > Acessado em Junho, 2019.

FERNANDES, P. R. D. et al. PHYTOCHEMICALS TESTS IN EXTRACTS aspidosperma pyrifolium. **IX Congresso de Iniciação Científica do IFRN**, p. 1063–1071, [s.d.].

FIORUCCI, A. R.; SOARES, M. H. F. B.; CAVALHEIRO, É. T. G. Alguns ácidos orgânicos do nosso cotidiano. **Química Nova na Escola**, n. 15, p. 6–10, 2002.

GOLEMANOV, K. TCHOLAKOVA, S.; DENKOV, N.; PELA, E.; STOYANOV, S. D. Surface Shear Rheology of Saponin Adsorption Layers. *Langmuir*, v. 28, p. 12071- 12084, 2012

GRANATO, E. M. et al. Prospecção fitoquímica da espécie vegetal *Trixis antimenorrhoea* (Schrank) Kuntze. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 2, p. 130–135, 2013.

HIROTA, B. et al. Estudo fitoquímico e das propriedades biológicas de *Jatropha multifida* L. (Euphorbiaceae). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

HU, RUIJIE; LI, WI; LV, QINGGUO; WU, TAIXIANG; AND TONG, NANWEI. Acarbose Monotherapy and Type 2 Diabetes Prevention in stern and Western Prediabetes: An

Ethnicity-specific Meta-analysis. **Clinical Therapeutics** 37, (8), p. 1798- 1812, 2015

JADHAV, V. . et al. *Hibiscus rosa sinensis* review. **Journal of Pharmacy Research**, v. 2, n. 7, p. 1168–1173, 2009.

JADHAV, V. . et al. Traditional medicinal uses of *Hibiscus rosa sinensis*. **Journal of Pharmacy Research**, v. 2, n. 8, p. 1220–1222, 2009.

KUSANO, C. et al. Novos compostos dietéticos com propriedades anticarcinogênicas
New dietetic compounds with anticarcinogenic properties. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 375–382, 2002.

LAMARRÃO, R. C.; FIALHO, E. Aspectos funcionais das catequinas do chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 2, p. 257-269, 2009.

LORRAINE, B.; COSTA, B.; FAFEMIG, B. Chá de hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) como auxiliar no tratamento da obesidade e diabetes. p. 6303, 2015.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Teores de catequinas e teaflavinas em chás comercializados no Brasil. **Ciencia e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 401–407, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos – Brasília: **Ministério da Saúde**, 2009, 136 p.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (BR), Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica. Brasília, DF: Ministério da Saúde; 2012. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**, Cadernos de Atenção Básica, vol 31.

MOJICA, L., RUI, L., MEJIA, E. G., *Hibiscus sabdariffa* L.: Phytochemical Compositions and Nutraceutical Properties, *Hispanic Foods: Chemistry and Bioactive Compounds*, Chapter 17, vol. 1109, pp 279-305, ISBN 13:9780841227460, 2012.

MUKHTAR, M.A. The effect of feeding rosella (*Hibiscus sabdariffa*) seed on broiler chicks performance. *Research Journal Animal and Veterinary Science*, v.2, p.21-23, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M.; **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6ª edição, Porto Alegre, Editora ARTMED, 2014.

PASSOS, C. S. et al. Revisão. v. 19, n. March, p. 140–149, 2009.

PEITZ, C. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e triagem fitoquímica das folhas de *Acacia longifolia* (Andr.) Willd. (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 2, p. 61–65, 2003.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. DAS G. Metabólitos secundários e hipertireodismo. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 1, p. 146–152, 2012.

PINTO, L. G. Q. et al. Efeito do tanino na digestibilidade dos nutrientes da ração pela tilápia do Nilo, *Oreochromis niloticus*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, n. 2, p. 677–681, 2004.

QUEIROZ, G. S. Análise de esteróides em extratos vegetais e estudo fitoquímico e biológico preliminar de *Brunfelsia uniflora*. n. Qmc 5512, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

SILVA, A. B. DA; WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H. C. Compostos químicos e atividade antioxidante analisados em *Hibiscus rosa-sinensis* L. (mimo-de-vênus) e *Hibiscus syriacus* L. (hibisco-da-síria). **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 19, n. 0, 2016.

SILVA, L. Triagem fitoquímica e discussão dos seus mecanismos em diferentes extratos aquosos de *Ocimum gratissimum* L., Universidade Federal de Lavras, 2018.

SILVEIRA, D. Comparação de métodos de determinação de umidade em matérias-primas de uso farmacêutico Comparação de métodos de determinação de umidade em matérias-primas de uso farmacêutico. Faculdade de Farmácia. Universidade Federal do Rio Grande do sul. Porto Alegre. 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, n. 1, p. 35–40, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da UFSC, 2007.

SOLOMONS, T. W. GRAHAM; FRYHLE, CRAIG B. Química orgânica: volume 1. 8. ed. Rio de Janeiro, RJ: LTC, 2005. 715 p. ISBN 9788521614494.

SOUZA, G. H. B. et al; **Farmacognosia - coletânea científica**, Ouro Preto, Editora UFOP, 2011.

THIRUMIRUGAN, D.; CHOLORAJAN, A.; RAJA, S. S. S.; VIJAYAKUMAR, R.; An Introductory Chapter: Secondary Metabolites, 2018. Disponível em < [dx.doi.org/10.5772/intechopen.79766](https://doi.org/10.5772/intechopen.79766) >, último acesso, junho, 2019.

UETA, B. et al. Atividade Antioxidante Da Catequina e Análise Comparativa Com As Vitaminas A e C. n. 2014, p. 23–25, 2014.

VIEIRA, P. M.; Avaliação da Composição Química, dos Compostos Bioativos e da Atividade Antioxidante de Seis Espécies de Flores Comestíveis, Tese de doutorado apresentada na Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2013.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. Amora-preta (*Rubus* sp.): Otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 33, n. 4, p. 1209–1214, 2011.