



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ- REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

NÁBILA EVELYN MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE EXTRATOS DE *Hibiscus sabdariffa* L. E DE NANOPARTÍCULAS DE
PRATA OBTIDAS POR SÍNTESE VERDE**

PARNAÍBA

2018

NÁBILA EVELYN MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE EXTRATOS DE *Hibiscus sabdariffa* L. E NANOPARTÍCULAS DE
PRATA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof. Dra. Durcilene Alves da Silva

Linha de pesquisa: Nanotecnologia aplicada à Biotecnologia

PARNAÍBA
2018

Ficha Catalográfica elaborada pela Bibliotecária
Christiane Maria Montenegro Sá Lins CRB/3 – 952

M386c

MARTINS, Nábila Evelyn

Caracterização e avaliação de atividades biológicas de extratos de *Hibiscus sabdariffa* L. e de nanopartículas de prata obtidas por síntese verde/ Nábila Evelyn Martins. – Parnaíba: Universidade Federal do Piauí - UFPI, 2018.

86 p. il.

Orientadora: Dra. Durcilene Alves da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Piauí, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia; Mestrado em Biotecnologia – UFPI, 2018.

1. Nanotecnologia. 2. Biotecnologia. 3. Química verde. I. Silva, Durcilene Alves da. II. Universidade Federal do Piauí. III. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. IV. Título. CDD 620.5

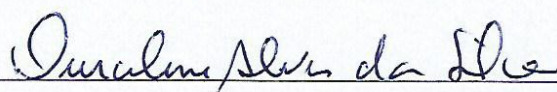
NÁBILA EVELYN MARTINS

**CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DE EXTRATOS DE *Hibiscus sabdariffa* L. E DE NANOPARTÍCULAS DE
PRATA OBTIDAS POR SÍNTESE VERDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

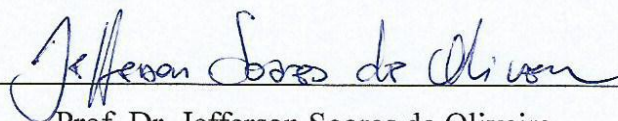
Aprovado em: 14/03/2018

BANCA EXAMINADORA



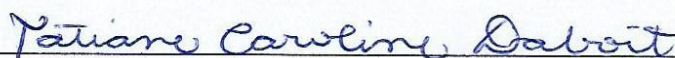
Profª. Dra. Durcilene Alves da Silva

Universidade Federal do Piauí (Orientadora)



Prof. Dr. Jefferson Soares de Oliveira

Universidade Federal do Piauí (membro interno)



Profª. Dra. Tatiane Caroline Daboit

Universidade Federal do Piauí (membro externo)

“Nenhuma ciência existe que haja saído prontinha do cérebro de um homem. Todas, sem exceção de nenhuma, são fruto de observações sucessivas, apoiadas em observações precedentes, como em um ponto conhecido para chegar ao desconhecido.”

(Allan Kardec – A gênese – item 54)

À minha amada vizinha Olinda (*in memoriam*)
e aos meus pais Francisco e Brasília,
meus exemplos de força,
dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, Pai de infinita bondade pela oportunidade de aprendizado contínuo na grande escola da vida.

Agradeço a minha orientadora Prof^a. Dr^a. Durcilene Alves da Silva, pela acolhida, disponibilidade, por todo o direcionamento e auxílio durante os dois anos de mestrado.

Agradeço ao Programa de pós-graduação em Biotecnologia (PPGBiotec) e à Universidade Federal do Piauí (UFPI) pelo apoio e subsídio estrutural durante os dois anos de curso. Agradeço a Capes/CNPq pelo auxílio financeiro concedido.

Agradeço a todos do Núcleo de Pesquisa em Biodiversidade e Biotecnologia (BIOTEC), por todas as vezes que me ajudaram seja direta ou indiretamente para o desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradeço de maneira especial ao Dr. Joilson Ramos de Jesus, por toda sua disponibilidade, presteza, apoio e amizade ao longo desses dois anos.

Agradeço à Janete, por toda a ajuda no tocante à coleta do material vegetal, bem como aos laboratórios parceiros Núcleo de Pesquisa em Plantas Medicinais (NPPM), Grupo de Reação e Análises Químicas (GRAQ) e Departamento de Química e Bioquímica da Universidade do Porto pelo desenvolvimento de algumas análises.

Agradeço a toda minha família, em especial meus pais Brasília e Francisco e aos meus irmãos Evelyne, Tacyane e Matheus pelo apoio e por serem meus pilares em todos os momentos.

Agradeço ao meu namorado Cristiano por todo o apoio ao longo desses dois anos, pela dedicação, ajuda, carinho e amor. Agradeço também aos meus sogros, Fátima e Orlando por todo o cuidado e apoio.

Agradeço aos amigos, próximos e distantes, em especial a minha amiga Jocélia do Carmo que vivenciou cada uma das etapas desde o início e superou cada um dos desafios junto comigo. Cada um teve uma parcela própria de contribuição para que a conclusão dessa etapa fosse possível.

RESUMO

O reino vegetal abriga espécies com grande importância medicinal. Vários são os estudos que buscam em extratos ou produtos derivados de plantas, compostos ativos responsáveis por propriedades de grande interesse farmacológico. Além disso, tais extratos estão sendo cada vez mais empregados em síntese verde de nanopartículas metálicas, especialmente de prata para aplicações em diversos campos, tais como física, química, ciência dos materiais, optoeletrônica, energias renováveis, remediação ambiental e dispositivos biomédicos. A espécie *Hibiscus sabdariffa* L., popularmente conhecida como vinagreira, é amplamente utilizada na culinária e medicina popular, devido a suas propriedades biológicas e grande capacidade nutricional. Já existem relatos da utilização de extratos de *H. sabdariffa* na formulação de nanopartículas de prata (AgNPs), mas poucos são os que verificam suas atividades biológicas. No presente estudo, objetivou-se realizar a caracterização e a avaliação de atividades antimicrobiana, antiparasitária, de inibição enzimática e hemolítica de extratos aquosos e etanólicos de folhas (EAHSF e EEHSF) e de cálices (EAHSC e EEHSC) de *H. sabdariffa*, bem como empregar os extratos aquosos na síntese verde de nanopartículas de prata, caracterizá-las e avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana e hemolítica das mesmas. Os maiores rendimentos foram obtidos nas extrações etanólicas (EAHSC – 6,2%; EAHSF – 7,4%; EEHSC – 15,6%; EEHSF – 16,6%). Todas as amostras apresentaram-se ácidas (pH = 2,4 – 3,3). De maneira geral, os perfis de constituintes fitoquímicos foram semelhantes entre as amostras, mas os perfis cromatográficos apresentaram diferenças. Verificou-se maior teor de compostos fenólicos em µg EAG/mg extrato, nos cálices (EEHSC – 31,06 ± 1,11; EAHSC – 24,86 ± 2,44) e maior teor de flavonoides em µg EEC/mg extrato nas folhas (EEHSF – 36,88 ± 1,47; EAHSF – 11,51 ± 0,60). Quanto às propriedades biológicas, EEHSF se destacou quanto à capacidade antioxidante (DPPH – 33,27 ± 2,87 mg Trolox/g extrato; ABTS e FRAP – 154,2 ± 2,8 e 45,33 ± 1,26 mg AAE/g extrato, respectivamente), enquanto que EAHSC demonstrou a maior atividade antileishmania (CI₅₀ = 128,974 µg/mL) e EEHSC exibiu maior atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (CI₅₀ = 2,798 mg/mL). As amostras não exibiram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas. Os extratos de cálices apresentaram-se mais biocompatíveis que os foliares com valores maiores de CH₅₀ em mg/mL (EEHSC – 2,95 ± 0,06; EAHSC – 2,47 ± 0,27). EAHSC demonstrou melhor resposta na formulação das AgNPs, onde as mesmas apresentaram tamanhos na escala nanométrica (50,2 nm), ABTS de 5,8 ± 6,1 µg AAE/mL de nanopartícula, ação antimicrobiana contra o fungo *Candida albicans* e as bactérias *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Salmonella typhimurium*, além de demonstrar maior biocompatibilidade que o nitrato de prata (CH₅₀ = 50,93 ± 3,15 µg Ag⁺/mL). Este estudo verificou várias potencialidades de *H. sabdariffa* e confirmou a síntese verde de AgNPs utilizando extrato aquoso da espécie, demonstrando que as mesmas podem ser utilizadas em aplicações na área médica.

Palavras-chaves: Antioxidantes, Acetilcolinesterase, *Leishmania* spp., Ação antimicrobiana, Hemólise

ABSTRACT

The plant kingdom contains species of great medicinal importance. Several studies have been looking for extracts or products derived from plants with active compounds responsible for properties of great pharmacological interest. In addition, these extracts are being increasingly used in green synthesis of metallic nanoparticles, especially silver's, for applications in different fields such as physics, chemistry, materials science, optoelectronics, renewable energies, environmental remediation and biomedical devices. The species *Hibiscus sabdariffa* L., popularly known as vinagreira, is widely used in cooking and folk medicine due to its biological properties and great nutritional capacity. There have been reports of the usage of extracts of *H. sabdariffa* in the formulation of silver nanoparticles (AgNPs), but few are those that verify their biological activities. The aim of this study was to characterize and evaluate the enzymatic inhibition, antimicrobial, antiparasitic and cytotoxic activities of aqueous and ethanolic extracts of leaves (EAHSF and EEHSF) and calyces (EAHSC and EEHSC) of *H. sabdariffa*, as well as, use the aqueous extracts in the green synthesis of silver nanoparticles, and analyze its characterization and evaluation of antioxidant, antimicrobial and hemolytic activities. The highest yields were obtained in ethanolic extractions (EEHSC – 15,6%; EEHSF – 16,6%). All samples were acidic (pH = 2,4 – 3,3). In general, the profiles of phytochemical constituents were similar among the samples, but the chromatographic profiles presented differences. The highest content of phenolic compounds in μg EAG/mg extract, it was found in the calyces (EEHSC – $31,06 \pm 1,11$; EAHSC – $24,86 \pm 2,44$) and higher flavonoid content in μg EEC/mg extract in the leaves (EEHSF = $36,88 \pm 1,47$; EAHSF = $11,51 \pm 0,60$). As regards the biological properties, EEHSF was distinguished in relation to the antioxidant capacity (DPPH – $33,27 \pm 2,87$ mg Trolox/g extract, ABTS and FRAP – $154,2 \pm 2,8$ and $45,33 \pm 1,26$ mg AAE/g extract, respectively), whereas EAHSC showed the highest antileishmania activity (IC₅₀ = 128,974 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and EEHSC exhibited higher inhibition activity of the acetylcholinesterase enzyme (IC₅₀ = 2,798 mg/mL). The samples showed no antimicrobial activity at the concentrations tested. The calyx extracts were more biocompatible than the leaves with values greater than CH₅₀ in mg/mL (EEHSC – $2,95 \pm 0,06$, EAHSC – $2,47 \pm 0,27$). EAHSC showed a better response in the formulation of AgNPs, where they showed sizes at the nanometer scale (50,2 nm), ABTS of $5,8 \pm 6,1$ μg AAE / mL nanoparticle, antimicrobial action against the fungus *Candida albicans* and bacteria *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Salmonella typhimurium*, and demonstrated greater biocompatibility than silver nitrate (CH₅₀ = $50,93 \pm 3,15$ μg Ag⁺ / mL). This study verified several potentials of *H. sabdariffa* and confirmed the green synthesis of AgNPs using aqueous extract of the species, demonstrating that they can be used in medical applications.

Keywords: Antioxidants, Acetylcholinesterase, *Leishmania* spp., Antimicrobial action, Hemolysis

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

- Figura 1.** *Hibiscus sabdariffa* L. A - planta em ambiente natural; B - flor; C – folhas e cálices com fruto 21
- Figura 2.** Esquema demonstrando processo de formação de nanopartículas de prata utilizando rota de redução química com borohidreto de sódio..... 27
- Figura 3.** Esquema evidenciando as forças repulsivas estabilizadoras criadas por íons de borohidreto adsorvidas nas superfícies de AgNPs. 28
- Figura 4.** Processo de síntese verde de nanopartículas de prata, evidenciando estabilização por moléculas orgânicas..... 29

CAPÍTULO 2

- Figura 1.** Desenho experimental para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos aquosos e etanólicos de *Hibiscus sabdariffa* frente ao fungo *C. albicans*. 40
- Figura 2.** Desenho experimental do ensaio *in vitro* de inibição da enzima acetilcolinesterase 42
- Figura 3.** Perfil cromatográfico (CLAE/UV, 290 nm – azul e 329 nm – rosa) de extrato aquoso de folhas de *Hibiscus sabdariffa* (EAHSF) com identificação dos tempos de retenção dos picos majoritários 46
- Figura 4.** Perfil cromatográfico (CLAE/UV, 290 nm – azul e 329 nm – rosa) de extrato etanólico de folhas de *Hibiscus sabdariffa* (EEHSF) com identificação dos tempos de retenção dos picos majoritários 47
- Figura 5.** Perfil cromatográfico (CLAE/UV, 290 nm – azul e 329 nm – rosa) de extrato etanólico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* (EEHSC) com identificação dos tempos de retenção dos picos majoritários 47
- Figura 6.** Perfil cromatográfico (CLAE/UV, 290 nm – azul e 329 nm – rosa) de extrato aquoso de cálices de *Hibiscus sabdariffa* (EAHSC) com identificação dos tempos de retenção dos picos majoritários 48
- Figura 7.** Espectros de absorção na região do infravermelho para extratos etanólicos (EEHSC e EEHSF) e aquosos (EAHSC e EAHSF) de cálices e folhas de *Hibiscus sabdariffa*, respectivamente 51

Figura 8. Estrutura química geral dos flavonoides e os comprimentos de onda atribuídos aos principais grupamentos químicos contidos nesses compostos por espectroscopia na região do infravermelho.....	52
Figura 9. Atividade antileishmania de extratos aquosos (EAHSC e EEHSF) e etanólicos (EEHSC e EEHSF) de cálices e folhas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> . Os resultados estão representados por média ± desvio padrão (*p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001).....	56
Figura 10. Porcentagens de inibição da atividade de AChE por extratos aquosos (EAHSC e EEHSF) e etanólicos (EEHSC e EEHSF) de cálices e folhas de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	57
Figura 11. Porcentagens de inibição da atividade de AChE por extrato etanólico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> (EEHSC).	57

CAPÍTULO 3

Figura 1. Desenho experimental para determinação da CIM de AgNP-EAHSC e AgNO ₃ frente às bactérias <i>E. coli</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. typhimurium</i> e ao fungo <i>C. albicans</i>	65
Figura 2. Mudança na coloração da solução de AgNP-EAHSC (A) dia da síntese; (B) 4 semanas após a síntese.....	66
Figura 3. Espectros de UV-VIS para as AgNPs. (A) AgNP-EAHSC; (B) AgNP-EAHSF.....	67
Figura 4. Espectros de absorção na região do infravermelho para EAHSC e AgNP-EAHSC. EAHSC - extrato aquoso de cálices; AgNP-EAHSC – nanopartículas de prata obtidas com extrato aquoso de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i>	68
Figura 5. Distribuição do tamanho e concentração de AgNP-EAHSC por análise de rastreamento de nanopartículas.	70

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1. Algumas atividades biológicas descritas para extratos de *Hibiscus sabdariffa* L...22

CAPÍTULO 2

Tabela 1. Porcentagem de rendimento de extração e valores de pH para extratos etanólicos e aquosos de *Hibiscus sabdariffa* L.....44

Tabela 2. Resultados para a prospecção fitoquímica realizada para extratos etanólicos e aquosos de *Hibiscus sabdariffa* L.....45

Tabela 3. Teores de compostos fenólicos e flavonoides presentes nos extratos de *Hibiscus sabdariffa*.....49

Tabela 4. Atividades antioxidantes determinadas por diferentes métodos de sequestro de radicais DPPH e ABTS e redução férrica (FRAP) de extratos de *Hibiscus sabdariffa* L.....52

Tabela 5. Concentrações inibitórias mínimas de extratos de *Hibiscus sabdariffa* frente ao fungo *C. albicans*.55

Tabela 6. Concentrações eficientes de extratos aquosos e etanólicos de *Hibiscus sabdariffa* para causar 50% de hemólise (CH50).59

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Tamanho médio, PDI e potencial zeta da AgNP-EAHSC.....69

Tabela 2. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de extratos de *Hibiscus sabdariffa*.....71

Tabela 3. Concentrações efetivas de AgNP-EAHSC e AgNO₃ para causar 50% de hemólise71

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EEHSC	Extrato etanólico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.
EEHSF	Extrato etanólico de folhas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.
EAHSC	Extrato aquoso de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.
EAHSF	Extrato aquoso de folhas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
FTIR	<i>Fourier-Transform Infrared Spectroscopy</i>
FRAP	<i>Ferric Reducing Antioxidant Power</i>
AChE	Enzima acetilcolinesterase
ATCI	Iodeto de acetiltiocolina
SV	Síntese verde
AgNPs	Nanopartículas de prata
NTA	<i>Nanoparticle Tracking Analysis</i>
DLS	<i>Dynamic Light Scattering</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
CI ₅₀	Concentração Efetiva capaz de causar 50% de inibição
CH ₅₀	Concentração Efetiva capaz de causar 50% de hemólise
CIM	Concentração Inibitória Mínima

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	16
OBJETIVOS	18
Objetivo geral	18
Objetivos específicos	18
CAPÍTULO 1	
1 <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	20
1.1 Composição fitoquímica de extratos de <i>H. sabdariffa</i>	21
1.2 Atividades biológicas de extratos de <i>H. sabdariffa</i>	22
2 NANOTECNOLOGIA	24
2.1 Nanopartículas de prata (AgNPs).....	25
2.2 Métodos de síntese de AgNPs	26
2.3 Síntese verde de AgNPs	28
2.4 Atividades biológicas de AgNPs.....	29
2.5 <i>Hibiscus sabdariffa</i> em nanotecnologia	30
3 CONSIDERAÇÕES FINAIS	31
CAPÍTULO 2	
1 INTRODUÇÃO	33
2 MATERIAIS E MÉTODOS	33
2.1 Obtenção dos materiais vegetais	33
2.2 Produção dos extratos.....	34
2.3 Determinação dos potenciais hidrogeniônicos dos extratos.....	34
2.4 Rendimento de extração	34
2.5 Caracterização fitoquímica dos extratos	34
2.6 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	37

2.7 Determinação do teor de compostos fenólicos totais	37
2.8 Determinação do teor de flavonoides	37
2.9 Atividades biológicas dos extratos	38
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
3.1 Rendimento de extração e potencial hidrogeniônico dos extratos	43
3.2 Prospecção fitoquímica dos extratos	44
3.3 Perfil cromatográfico dos extratos	45
3.4 Quantificação dos teores de compostos fenólicos e flavonoides	48
3.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) ...	50
3.6 Atividades biológicas dos extratos	52
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	59

CAPÍTULO 3

1 INTRODUÇÃO	62
2 MATERIAIS E MÉTODOS	62
2.1 Síntese das AgNPs	62
2.2 Caracterização das AgNPs	63
2.3 Atividades biológicas das AgNPs	64
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
3.1 Caracterização das AgNPs	66
3.2 Atividades biológicas de AgNP-EAHSC	70
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	72

PERSPECTIVAS	73
---------------------------	-----------

REFERÊNCIAS	74
--------------------------	-----------

INTRODUÇÃO GERAL

Desde os primórdios da civilização os seres humanos buscam na utilização de produtos naturais, especialmente derivados da flora, uma alternativa para a prevenção, tratamento e/ou cura de diversas enfermidades (FIRMO et al., 2011). Esses produtos estão presentes em sementes, raízes, folhas, frutos, flores entre outras partes de plantas conhecidas como medicinais, ou seja, aquelas que possuem compostos ativos capazes de gerar efeitos terapêuticos diretos ou indiretos (JAMSHIDI-KIA; LORIGOOINI; AMINI-KHOEI, 2018).

A indústria farmacêutica cada vez mais tem interesse no desenvolvimento de pesquisas científicas que identifiquem e comprovem propriedades biológicas de extratos vegetais. O mercado global de produtos naturais, principalmente derivados do reino vegetal é estimado em mais de US\$ 80 bilhões e são eles que geram cerca de metade dos fármacos. As drogas à base de plantas e extratos vendidos como suplementos dietéticos, alimentos ou medicamentos são os principais produtos comercializados em redes de farmácias (BILIA et al., 2017).

Uma espécie já bastante utilizada como medicinal em todo o mundo é a *Hibiscus sabdariffa* L., conhecida popularmente como vinagreira. Além do emprego na medicina popular, essa planta também é empregada na culinária em algumas regiões, devido a sua grande capacidade nutricional (SOBOTA; PINHO; OLIVEIRA, 2016). Extratos dessa espécie apresentam muitos fitoconstituintes com importância farmacológica, tais como antocianinas, flavonoides, polissacarídeos e ácidos orgânicos, incluindo o málico, o ascórbico, o hidroxicítrico, o protocatecuico e ácidos de *Hibiscus*. Tais extratos também são ricos em minerais, tais como ferro, cálcio e fósforo e, possuem baixo conteúdo de glicose (MARGANHA et al., 2010; HASSAN; BERCHOVÁ; SUDOMOVÁ, 2016). Algumas atividades já investigadas e comprovadas para a espécie são a antioxidante, a antimicrobiana, a anti-inflamatória e a anticancerígena (ZHANG et al., 2014; BORRÁS-LINARES et al., 2015).

Extratos de plantas têm ganhado uma atenção especial no campo nanotecnológico. Essa área está relacionada à criação e utilização de materiais com constituintes em escala nanométrica, ou seja, com dimensões que não ultrapassem 1×10^{-6} m e vem se tornando um dos mais promissores campos de pesquisa tecnológica, visto que a mesma explora a atividade elétrica, ótica e magnética, bem como o comportamento estrutural em nível molecular e submolecular das partículas (HASAN, 2015).

São utilizados materiais de composições diferentes como polímeros e metais para criar estruturas modificadas em uma escala nanométrica, que passam a ter novas e diferentes propriedades, o que lhes garante uma melhor eficiência, facilitando suas aplicações em

diferentes campos. Os sais de prata, por exemplo, já têm propriedades antibacterianas conhecidas há muito tempo e formulações que utilizam o metal para síntese de nanomateriais podem potencializar esse efeito e até ajudar na biocompatibilidade do sal, reduzindo seus efeitos tóxicos em seres humanos (KIM et al., 2007).

O avanço das pesquisas nessa área evidenciou a necessidade do surgimento de tecnologias biosintéticas e novas rotas de síntese de nanomateriais que fossem viáveis e ambientalmente seguras (RAI; YADAV; GADE, 2009), como a síntese verde (SV), rota de formulação de nanopartículas metálicas viável e biocompatível que utiliza biomoléculas produzidas por organismos vivos (bactérias, fungos, plantas) como agentes redutores e estabilizantes, substituindo reagentes tóxicos geralmente utilizados para redução química. O método mais ecológico utilizado para síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) é o que utiliza extratos de plantas (MITTAL; CHISTI; BANERJEE, 2013; AHMED et al., 2016). A literatura já descreve o emprego de diversas espécies vegetais para esse propósito (BAGHAYERI et al., 2018; KUMAR; KUMAR; AGRAWAL, 2018; YAO et al., 2018).

Já existem relatos da utilização de extratos de *H. sabdariffa* para formulação de nanopartículas metálicas (THOVHOGI et al., 2015; MISHRA et al., 2016; THOVHOGI et al., 2016; ALSHEHRI; MALIK, 2017; MAHENDIRAN et al., 2017), mas poucos são os relacionados à SV de AgNPs (KUMAR et al., 2014; CATALDO; URSINI; ANGELINI, 2016; KALITA; GANGULI, 2016). Dessa forma, visto as muitas propriedades já descritas para *H. sabdariffa* e o perfil fitoquímico de diferentes extratos da espécie que evidencia sua alta quantidade de compostos fenólicos e elevada capacidade antioxidante, torna-se interessante a busca de rotas de síntese de AgNPs utilizando os extratos da planta, assim como a investigação de suas atividades biológicas, visando seu possível emprego em diversas aplicações, inclusive médica.

OBJETIVOS

Objetivo geral

Realizar a caracterização e a avaliação de atividades biológicas de extratos de *Hibiscus sabdariffa* e de nanopartículas de prata produzidas por meio de síntese verde utilizando extratos aquosos da espécie.

Objetivos específicos

- Produzir extratos etanólicos e aquosos de *H. sabdariffa*;
- Determinar o perfil de fitoconstituintes dos extratos por análises qualitativas e cromatográfica;
- Determinar o teor de compostos fenólicos e flavonoides dos extratos;
- Avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana, antiparasitária, de inibição da enzima acetilcolinesterase e hemolítica dos extratos produzidos;
- Sintetizar e caracterizar nanopartículas de prata obtidas por síntese verde utilizando extratos aquosos de *H. sabdariffa*;
- Avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana e hemolítica das nanopartículas sintetizadas.

CAPÍTULO 1

REVISÃO DE LITERATURA

1 *Hibiscus sabdariffa* L.

O gênero *Hibiscus* está inserido na classe das Dicotiledôneas, sendo um dos maiores gêneros da família Malvaceae, constituído por cerca de 200 espécies, distribuídas em regiões tropicais e subtropicais, abrangendo inclusive representantes com grande importância econômica. No Brasil, as principais espécies do gênero utilizadas como plantas ornamentais são *H. rosa-sinensis* L. e *H. schizopetalus* (Dyer) Hook. f., outras como *H. sabdariffa* L. e *H. acetosella* Welw. ex Hiern, além de apresentarem potencial ornamental, são empregadas na alimentação e medicina popular, ainda existindo espécie *Hibiscus cannabinus* Kenaf como importante fornecedora de fibra têxtil (ESTEVES; DUARTE; TAKEUCHI, 2014).

Hibiscus sabdariffa L. (figura 1) é conhecida por várias denominações, tais como vinagreira, hibisco, rosela, azedinha, caruru-azedo, quiabo-azedo, entre outras. É uma planta empregada para múltiplos usos, com importância ornamental, nutricional e medicinal. Essa espécie é originária do continente asiático, sendo posteriormente introduzida na África, de onde foi trazida ao Brasil na época do tráfico de escravos (SOBOTA; PINHO; OLIVEIRA, 2016).

Caracteriza-se por ser um arbusto ereto e ramificado que atinge alturas superiores a 1,80 metros, com ciclo anual. A corola é formada por cinco sépalas de coloração vermelha dispostas em cone, formando o cálice. Na base do cálice está o cálculo, de formato pontiagudo e disposto em círculo, onde estão localizados a cápsula deiscente aveludada e o fruto, medindo aproximadamente dois centímetros de comprimento que abriga as sementes. Sua flor é simples, séssil e axilar. As folhas são verdes, alternas, longo-pecioladas, palmatilobadas com três a cinco lobos estreitos e agudos e nervuras arroxeadas. Desenvolve-se melhor em regiões cujo clima é quente, visto sua grande sensibilidade a baixas temperaturas. Necessita de 800 a 1600 mm de chuvas e temperaturas entre 18 e 35 °C para se desenvolver (MARGANHA et al., 2010; MACIEL et al., 2012; ROSA, 2013).

As partes mais utilizadas da vinagreira são as folhas e os cálices. Por se tratar de uma hortaliça não convencional, as folhas são bastante utilizadas em preparações de alimentos regionais como por exemplo o arroz de cuxá, comida típica do estado do Maranhão, além de saladas *in natura* e outros alimentos em que são utilizadas no processo de cocção (CÂNDIDO; STURZA; BARBOSA, 2017). Já os cálices são utilizados, principalmente como infusões em chás para o tratamento empírico de diversas condições, como por exemplo distúrbios

gastrointestinais, doenças hepáticas, febre, hipercolesterolemia e hipertensão, além de funcionar como diurético (FORMAGIO et al., 2015).

Figura 1. *Hibiscus sabdariffa* L. A - planta em ambiente natural; B - flor; C – folhas e cálices com fruto.



Fonte: Autoria própria (2016)

1.1 Composição fitoquímica de extratos de *H. sabdariffa*

A literatura relata diversos estudos de rastreio para os compostos fitoquímicos de *H. sabdariffa* (FREITAS; SANTOS; MOREIRA, 2013; OKEREKE; IROKA; CHUKWUMA, 2015; ZHEN et al., 2016), existindo certa variação na composição entre os estudos, provavelmente devido a diferentes variedades, condições genéticas, ambientais, ecológicas e de colheita da planta (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014).

As folhas e os cálices da espécie contêm muitos constituintes químicos, tais como alcaloides, proteínas, lipídeos, carboidratos, fibras, β -caroteno, ácido ascórbico, ácido araquídico, ácido cítrico, ácido málico, ácido tartárico, ácido protocatéquico, ácido hidroxicítrico, ácido clorogênico e seus isômeros, ácido neoclorogênico, ácido criptoclorogênico pectina, quercetina, cálcio, ferro e fósforo (ISMAIL et al., 2008; MARGANHA et al., 2010; KAPEPULA et al., 2017).

Os principais constituintes da planta com aplicações registradas no contexto farmacológico são os ácidos orgânicos, flavonoides, polissacarídeos e antocianinas, estando os dois últimos mais presentes nos cálices secos da espécie (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014).

1.2 Atividades biológicas de extratos de *H. sabdariffa*

Existe um crescente interesse da comunidade científica em investigar os reais benefícios de plantas utilizadas na medicina popular e no que concerne a *H. sabdariffa* são reportados alguns estudos que confirmam as propriedades terapêuticas dessa espécie, relatando diversas atividades biológicas de seus extratos como demonstrado na tabela 1.

Tabela 1. Algumas atividades biológicas descritas para extratos de *Hibiscus sabdariffa* L.

Atividade	Parte vegetal	Referências
Antioxidante	Flores; cálices; frutos; sementes	(USOH et al., 2005; SALAZAR-GONZÁLEZ et al., 2012; MACIEL et al., 2012; YANG et al., 2012; ZHANG et al., 2014; BORRÁS-LINARES et al., 2015; SOBOTA et al., 2016)
Antimicrobiana	Cálices; frutos	(OLALEYE, 2007; MACIEL et al., 2012; PAIM et al., 2017; RANGEL-VARGAS et al., 2017)
Anti-inflamatória	Cálices; folhas	(ALI et al., 2011; ZHEN et al., 2016)
Antitumoral	Flores; cálices; folhas	(ZHANG et al., 2014; FORMAGIO et al., 2015)
Hepatoprotetora	Flores; cálices	(YIN et al., 2011; NURKHASANAH, 2015; EZZAT et al., 2016)
Cardioprotetora	Cálices	(ZAINALABIDIN et al., 2016; HOSSEINI; BAKHTIARI; MOUSAVI, 2017)
Diurética	Cálices	(ALARCÓN-ALONSO et al., 2012; JIMÉNEZ-FERRER et al., 2012)

Fonte: Autoria própria (2018)

O potencial antioxidante relaciona-se com uma capacidade protetora contra o dano oxidativo que é causado por um desequilíbrio entre produção e acumulação de espécies reativas ao oxigênio (EROs) em células e tecidos e a capacidade de desintoxicação do sistema biológico. As EROs estão bastante associadas ao desenvolvimento e progressão de diversas condições patológicas, tais como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas e câncer (PARHIZ et al., 2015; PIZZINO et al., 2017).

Tal atividade vem sendo bastante investigada em plantas, especialmente as alimentícias, pois as mesmas têm uma habilidade inata de biossintetizar uma ampla gama de antioxidantes não enzimáticos capazes de atenuar o dano oxidativo, desempenhando um importante papel protetor na prevenção e no retardo do progresso de muitas doenças crônicas e, além disso, apresentam uma chance menor de causar toxicidade quando consumidas (KASOTE et al., 2015; SEUNG et al., 2016).

Já foi demonstrado que existe uma correlação positiva entre o conteúdo de compostos bioativos, tais como compostos fenólicos, terpenos, aldeídos e flavonoides e as atividades antioxidante e antimicrobiana de alguns extratos de plantas, o que surge como uma alternativa à problemática do uso indiscriminado de agentes antimicrobianos que está agravando o quadro da resistência de microrganismos à principal forma de combate aos mesmos (KYUNG, 2012; AZIZ; KARBOUNE, 2016; KUMAR et al., 2018).

Entre os distúrbios neurodegenerativos que tem sua patogênese relacionada ao estresse oxidativo, a doença de Alzheimer (DA) tem um especial destaque, por se tratar de uma condição clínica progressiva até então sem cura e afetar milhões de pessoas em todo o mundo (MURRAY et al., 2013). A hipótese colinérgica afirma que a DA é desencadeada pela perda progressiva de sinapses colinérgicas no hipocampo e no neocórtex. A redução da concentração do neurotransmissor acetilcolina parece ser um elemento crítico no desenvolvimento da demência e a abordagem terapêutica mais apropriada para o tratamento de DA seria restaurar os níveis de acetilcolina inibindo as principais formas de colinesterase: acetilcolinesterase (AChE) e butirilcolinesterase (BuChE) (AHMED et al., 2013).

Dessa maneira, várias pesquisas buscam encontrar potenciais inibidores de colinesterases em produtos naturais, principalmente os ricos em polifenóis, visto que já existem relatos que tais compostos exercem atividade neuroprotetora, sendo capazes de atravessar a barreira hematoencefálica, melhorando a neurotransmissão (FIGUEIRA et al., 2017) e vários estudos já demonstraram essa atividade em extratos de diferentes espécies de plantas medicinais

(DALAI et al., 2014; MALAR et al., 2017; SINGH; RAMASSAMY, 2017). Joshi e colaboradores em 2006, avaliaram a atividade nootrópica de extrato aquoso de cálices de *H. sabdariffa* em camundongos e verificaram que o mesmo tem potencial para o tratamento de doenças neurodegenerativas em idosos, possivelmente devido ao seu potencial anti-acetilcolinesterase.

Outra atividade que vem sendo bastante investigada em extratos vegetais é a antiparasitária, especialmente a antileishmania. Desde 1984, esse potencial é avaliado em diferentes espécies de plantas medicinais por meio de testes *in vitro* e *in vivo* (ROCHA et al., 2005), e, até os dias atuais, vários são os estudos que buscam ação leishmanicida em extratos vegetais (KAUR; KAUR, 2018; ARÉVALO-LOPÉZ et al., 2018), visto que a utilização das principais terapias para leishmanioses está sendo limitada por suas elevadas toxicidades e aumento alarmante de suas ineficácias terapêuticas (SAHA; MUKHOPADHYAY; CHATTERJEE, 2011).

Vários são os fitoconstituintes que demonstram poderosa atividade antileishmania incluindo compostos fenólicos, tais como auronas, chalconas, flavonoides, saponinas, alcaloides, taninos entre outros (SEN; CHATTERJEE, 2011), e, mesmo o *Hibiscus sabdariffa* possuindo tais compostos não há, na literatura, muitos estudos que avaliam a atividade antileishmania de compostos isolados ou de extratos da espécie, sendo que nestes foram utilizadas apenas duas espécies *Leishmania donovani* (ABU-MEJDAD; AL-HILFY, 2013) e *Leishmania major* (HAMARSHEH et al., 2017).

É de extrema importância o rastreamento dessa atividade para outras espécies de interesse clínico como por exemplo a *Leishmania amazonensis*, agente etiológico das formas clínicas mais graves de leishmaniose cutânea (WHO, 2010), visto que os tratamentos recomendados para tais manifestações têm sido associados a casos de infecção persistente, fato relacionado à capacidade deste parasita em modular o sistema imunológico do hospedeiro, sendo, dessa forma, difícil o realizar o tratamento dessas condições sem efeitos adversos (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2013).

2 NANOTECNOLOGIA

A nanotecnologia é uma área de desenvolvimento multidisciplinar relacionada a diversos avanços tecnológicos que se baseia na manipulação de átomos e moléculas de tamanho nanométrico, ou seja, com dimensões que variam de 1 a 1000 nanômetros (nm). Um nanômetro

equivalente a 1 bilionésimo de um metro (10^{-9} m) (MARTINS, 2015; SARAIVA et al., 2016). Essa tecnologia utiliza diferentes materiais, tais como metais e polímeros para criação de novas estruturas que apresentem diversas propriedades e possam ser aplicadas em vários campos, como por exemplo, na ciência de materiais, na medicina, na agricultura, na indústrias farmacêuticas, químicas, de alimentos e de cosméticos, entre outros (PASCHOALINO; MARCONE; JARDIM, 2010).

Por possuírem tamanhos extremamente reduzidos, as nanopartículas apresentam grande relação superfície/volume exibindo, dessa forma, propriedades (físicas, químicas e biológicas) totalmente diferentes de partículas maiores, como por exemplo alterações em sua área superficial, reatividade química, condutibilidade elétrica, variedade de cores e até mesmo na tolerância a determinadas temperaturas. Portanto, tais estruturas são estratégias interessantes e promissoras para diversas aplicações e cada tipo de nanopartícula é escolhida com base na característica mais adequada ao aproveitamento das mesmas em cada caso (FERREIRA; RANGEL, 2009).

Nas indústrias de cosméticos e farmacêutica, as nanopartículas poliméricas têm se destacado principalmente devido a suas propriedades de entrega direcionada e liberação controlada de substâncias ativas. Nanoemulsões e lipossomas são utilizados principalmente para incorporação de compostos lipofílicos (ANTONIO et al., 2014). Já as nanopartículas de metálicas são bastante úteis em atividades catalíticas, apresentando também potenciais aplicações na área médica (WANG; GU, 2015).

2.1 Nanopartículas de prata (AgNPs)

As nanopartículas metálicas, especialmente as de metais nobres, tais como ouro, prata e platina vêm ganhando cada vez mais atenção por possuírem uma ampla gama de aplicações. Dentre essas estruturas, as AgNPs têm ganhado especial destaque, devido a suas propriedades únicas, como estabilidade química, boa condutividade, atividade catalítica e principalmente suas potencialidades antibacteriana, antiviral e antifúngica (AHMED et al., 2016). Tais características dependem do tamanho, forma e revestimentos de superfície das AgNPs. Sendo assim, é de extrema importância que a morfologia e as propriedades físico-químicas dessas partículas sejam bem controladas (WEI et al., 2015).

Dentre vários materiais utilizados para formulação de nanopartículas metálicas como o cobre, o zinco, o titânio, o magnésio, o ouro e o alginato, a prata vêm se destacando por

apresentar alta eficiência em relação a alguns metais, possuindo uma boa ação antimicrobiana contra bactérias, vírus e outros microorganismos eucarióticos por exemplo, desempenhando, dessa forma, um importante papel no campo da nanotecnologia e da nanomedicina (LOGESWARI; SILAMBARASAN; ABRAHAM, 2015).

As nanopartículas metálicas são extensivamente aplicadas em produtos que têm contato direto com o corpo humano, como produtos de higiene, limpeza e cosméticos, além daqueles com aplicações médicas e farmacêuticas. Portanto, existe a grande necessidade de desenvolver novas estratégias para a síntese de nanopartículas que não utilizem produtos químicos tóxicos. Métodos biológicos que utilizam microorganismos, enzimas ou extratos vegetais estão surgindo como possíveis alternativas, simples, viáveis e ambientalmente seguras (KAVITHA; THIRUMURUGAN; NADU, 2017).

2.2 Métodos de síntese de AgNPs

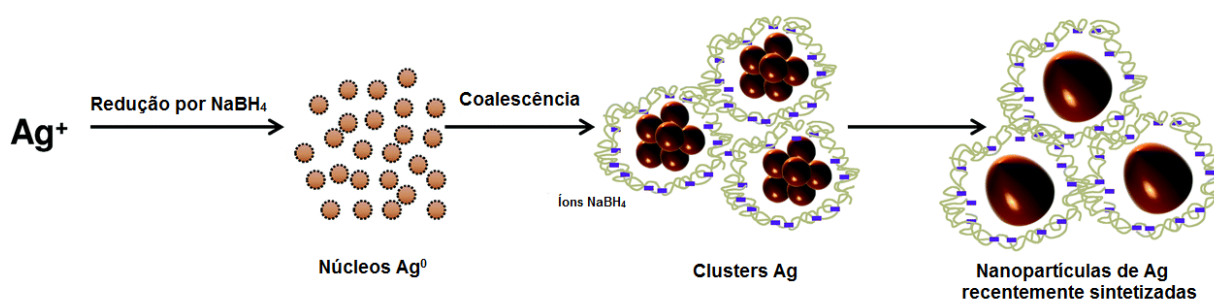
Existem, atualmente, diversos métodos de síntese para as AgNPs, tais como químicos, físicos, biológicos (IRAVANI et al., 2014) e fotoquímicos (ZAAROUR, 2014), cada um com suas vantagens, tais como a facilidade do processo e a possibilidade de controle sobre o tamanho das partículas e com desvantagens, incluindo custos, estabilidade e necessidade de elevadas quantidades de materiais e alto consumo de energia (ABBASI et al., 2016).

Os métodos químicos são os mais frequentemente utilizados para a síntese de AgNPs e podem ser subdivididos em redução química, técnicas eletroquímicas, por irradiação e por pirólise (WEI, 2015). A síntese de AgNPs em solução necessita de três componentes principais: o precursor do metal (prata), agentes redutores e agentes estabilizantes, sendo que propriedades como tamanho uniforme e monodispersidade podem ser conseguidos controlando as fases de nucleação e empilhamento dos núcleos alterando parâmetros experimentais como o precursor, pH, temperatura e agentes redutores (HAIDER; KANG, 2015). Os redutores geralmente utilizados incluem borohidreto de sódio, citrato de sódio, ácido ascórbico, álcool e compostos de hidrazina (WEI et al., 2015).

No método de redução química (figura 2), os íons metálicos em solução são reduzidos em condições que favorecem a formação de pequenos agregados metálicos. Utilizam-se, nessa rota, substâncias químicas para funcionarem como agentes redutores. O que ocorre nesse processo é uma reação de redução, onde os íons do agente redutor como por exemplo o borohidreto de sódio (NaBH_4), reduzem os íons Ag^+ , transformando-os em Ag^0 . Dessa forma,

os núcleos de prata, por meio do processo de coalescência agrupam-se formando *clusters* que crescem a medida que mais núcleos se agregam, até que ocorre a estabilização da partícula, que pode ser pela adição de um agente estabilizante ou excesso de agente redutor, onde seus íons acabam por desempenhar a mesma função (AGNIHOTRI; MUKHERJI; MUKHERJI, 2014).

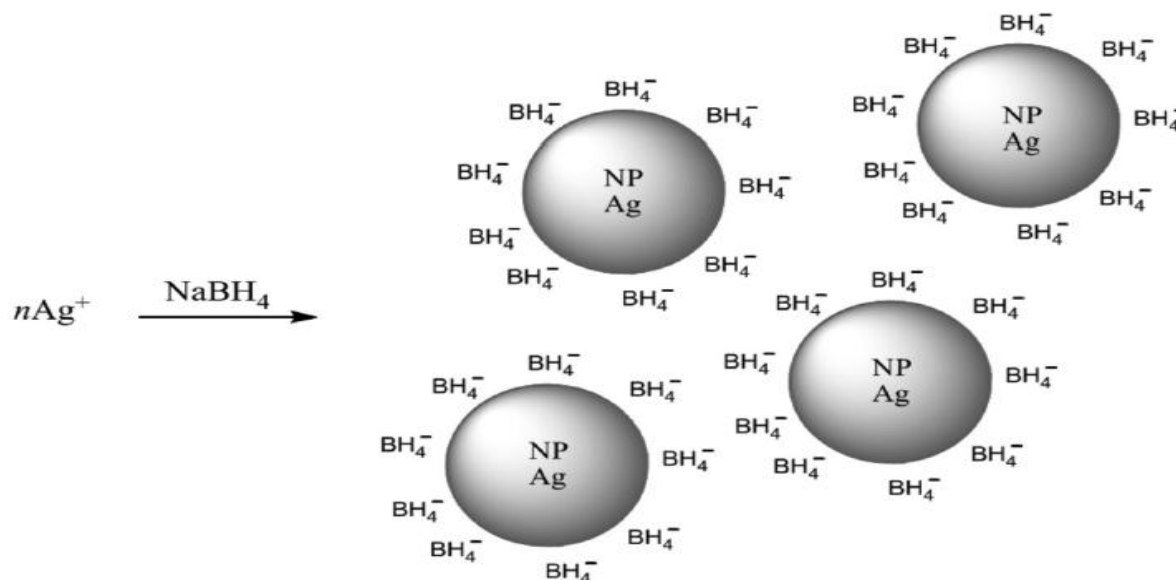
Figura 2. Esquema demonstrando processo de formação de nanopartículas de prata utilizando rota de redução química com borohidreto de sódio.



Fonte: Adaptado de Agnihotri; Mukherji; Mukherji, 2014.

A maior dificuldade desse método é a obtenção de estabilidade, visto que as nanopartículas exibem alta energia superficial, o que favorece termodinamicamente a instantânea agregação das mesmas para formar ligações metálicas. Como alternativa, são utilizados durante o processo de síntese de nanopartículas agentes estabilizantes, que se adsorvem sobre a superfície das mesmas formando uma camada auto-organizada, impedindo a agregação entre elas. Geralmente, os mais eficazes são os estabilizantes poliméricos, como por exemplo, poli(vinilpirrolidona), poli(álcool vinílico) e ácido poliacrílico), os quais possuem, em suas estruturas sítios básicos de Lewis com alta afinidade pelas nanopartículas, e cadeias orgânicas suficientemente longas capazes de criar um estereoipecimento, impossibilitando que haja interação entre as mesmas. A estabilidade também pode ser alcançada com o uso em excesso, durante a reação de síntese, de agentes redutores, pois seus íons podem se adsorver nas superfícies das nanopartículas, gerando repulsões eletrostáticas entre estas tal qual mostrado na figura 3 (MELO JR et al., 2012).

Figura 3. Esquema evidenciando as forças repulsivas estabilizadoras criadas por íons de borodreto adsorvidas nas superfícies de AgNPs.



Fonte: Melo Jr et al., 2012

Alguns métodos de síntese químicos são potencialmente perigosos para o ambiente, por envolverem o uso de produtos químicos tóxicos. Diante dessa problemática, houve o surgimento de novas rotas de síntese mais simples, viáveis e biocompatíveis chamadas de síntese biológica ou verde, biosíntese ou química verde, que utilizam biomoléculas, tais como proteínas, carboidratos e antioxidantes produzidas por organismos vivos, incluindo bactérias, fungos e plantas para substituir os agentes convencionais de redução e de estabilização na formulação de AgNPs. (HAIDER; KANG, 2015; AHMED et al., 2016).

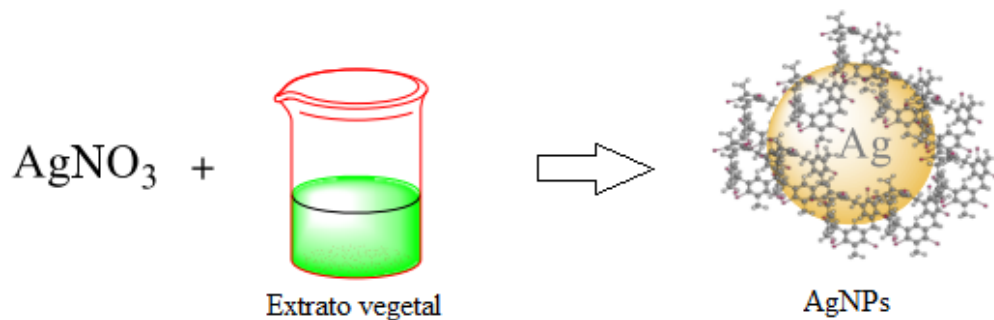
2.3 Síntese verde de AgNPs

A síntese verde apresenta alguns possíveis mecanismos que incluem redução enzimática e não enzimática. O método mais ecológico e utilizado de química verde para a formulação de AgNPs é o que utiliza extratos de plantas (WEI et al., 2015).

O processo de redução dos íons de prata para produção de nanopartículas utilizando extratos de plantas é bastante simples, onde o extrato é misturado com uma solução do sal metálico à temperatura ambiente. A redução ocorre devido a presença de agentes bio-redutores

no extrato, tais como compostos fenólicos, terpenoides, polissacarídeos e flavonas que funcionam como agentes de transferência de elétrons, transformando os íons Ag^+ em Ag^0 , facilitando a agregação dos íons e a consequente formação e estabilização das nanopartículas. (KUMAR; CHISTI; CHAND, 2013; GHOLAMI-SHABANI; AKBARZADEH, 2014) como descrito na figura 4.

Figura 4. Processo de síntese verde de nanopartículas de prata, evidenciando estabilização por moléculas orgânicas.



Fonte: Adaptado de Patel et al. (2015)

Nessa rota de síntese, algumas variáveis, como por exemplo a natureza e a concentração do extrato vegetal e do sal metálico, o pH, a temperatura e o tempo de contato podem afetar características das nanopartículas como sua taxa de produção e quantidade, influenciando, assim, a eficiência de suas possíveis aplicações (DWIVEDI; GOPAL, 2010).

Extratos de diferentes partes de diversas espécies vegetais já foram utilizados em rotas de síntese verde para formulação de AgNPs, utilizadas para várias aplicações, tais como antibacteriana (FATIMAH, 2016; TIPPAYAWAT; PHROMVIYO; BOUEROY, 2016), antioxidante (PHULL et al., 2016; SHAH et al., 2017; SUDHA; JEYAKANTHAN; SRINIVASAN, 2017), catalítica (ARYA et al., 2017; MUTHU; PRIYA, 2017; VINAYAGAM; VARADAVENKATESAN; SELVARAJ, 2017), entre outras.

2.4 Atividades biológicas de AgNPs

As AgNPs são utilizadas em diferentes áreas e apresentam uma gama de aplicações, entre as quais sua atividade antimicrobiana de largo espectro, é a propriedade mais explorada e

a que melhor direciona o desenvolvimento de produtos utilizando essas partículas (GOODMAN et al., 2014).

Existe mais de um mecanismo relacionado a atividade antibacteriana das AgNPs. Possivelmente, os íons de prata liberados por nanopartículas podem penetrar nas células bacterianas, sendo reduzidos a medida que a célula se esforça para eliminá-los, o que leva à destruição celular. As AgNPs de tamanhos menores também podem criar poros nas paredes celulares bacterianas e, dessa forma, o conteúdo citoplasmático extravasa para o meio e consequentemente ocorre a morte celular (BILAL et al., 2017).

Outra atividade que vêm sendo bastante relatada na literatura para as AgNPs é a antioxidante. Estudos relatam tal atividade para AgNPs biossintetizadas com a utilização de diferentes espécies vegetais que apresentam tal propriedade como por exemplo *Tabernaemontana divaricata* (ANBUKKARASI et al., 2017) e a *Tribulus longipetalus* (DJAHANIANI et al., 2016).

2.5 *Hibiscus sabdariffa* em nanotecnologia

Até o momento, a literatura relata alguns estudos que utilizam extratos de *H. sabdariffa* para formulação biológica de nanopartículas metálicas (THOVHOGI et al., 2015; MISHRA et al., 2016; THOVHOGI et al., 2016; ALSHEHRI; MALIK, 2017; MAHENDIRAN et al., 2017), sendo poucos os que utilizam os extratos dessa espécie para síntese de AgNPs (KUMAR et al., 2014; CATALDO; URSINI; ANGELINI, 2016; KALITA; GANGULI, 2016). A maioria desses estudos buscam novas rotas de síntese e são escassas as pesquisas que determinam suas atividades biológicas.

Kumar e colaboradores (2014) formularam AgNPs por uma nova rota de síntese verde utilizando extratos aquosos de folhas e caules da espécie e a luz solar como catalisador, verificando seu potencial para detecção colorimétrica seletiva de íons metálicos Hg^{2+} , Cd^{2+} e Pb^{2+} , potencialmente perigosos para a saúde e para o meio ambiente, a nível de ppm na água. Ainda no mesmo estudo, foi verificada que algumas das AgNPs formuladas com o extrato foliar demonstraram atividade contra *Escherichia coli*, enquanto que nenhuma das formuladas com caule possuiu atividade frente à bactéria.

Em 2016, Cataldo e colaboradores testaram novas rotas de síntese verde utilizando extratos aquosos de cálices de *H. sabdariffa* em que foram empregados métodos de fotólise, radiólise e redução química, mas não rastreamos possíveis atividades biológicas das

nanopartículas. Ainda em 2016, Kalita e colaboradores também sintetizaram AgNPs, mas utilizando extratos aquosos de folhas da espécie e verificaram a eficácia das nanopartículas como catalisadoras na redução do 4 nitrofenol.

3 CONSIDERAÇÕES GERAIS

H. sabdariffa é uma planta medicinal bastante utilizada em todo o mundo e muitas são as variações em sua composição química e propriedades biológicas dependendo das áreas geográficas e formas de extração de compostos. A utilização da espécie em síntese verde de AgNPs já é descrita, mas ainda se fazem necessários estudos que identifiquem suas principais atividades biológicas, principalmente relacionadas à área médica com o objetivo de direcionar aplicações para as mesmas.

CAPÍTULO 2

CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE EXTRATOS DE *Hibiscus sabdariffa* L.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais remonta a épocas primitivas e reflete a realidade de parte de população brasileira. Os conhecimentos etnobotânicos observados em muitas regiões são adquiridos empiricamente, mas acabam direcionando os estudos de rastreio de atividades biológicas em diferentes espécies utilizadas na medicina popular (SILVA et al., 2000). Alguns aspectos químicos, bem como as potencialidades de plantas medicinais podem ser bastante variáveis a depender, por exemplo, da área geográfica, visto que a produção de metabólitos secundários são influenciados por vários aspectos, tais como temperatura, intensidade de precipitações e radiação solar, umidade, além da quantidade de macro e micronutrientes do solo (AL-RIMAWI et al., 2014; SAMPAIO; EDRADA-EBEL; COSTA, 2016).

Hibiscus sabdariffa é uma espécie bastante utilizada em várias regiões do mundo na culinária e na medicina popular (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014). Suas aplicações diurética (ALARCÓN-ALONSO et al., 2012) e antihiperlipidêmica (OCHANI; MELLO, 2009) têm agregado bastante valor à mesma, fazendo com que seja cada vez mais conhecida em diferentes regiões, ficando evidente, dessa forma, a importância da realização de estudos para comprovação de atividades biológicas e avaliação de toxicidade para a espécie.

Dessa forma, o presente estudo teve como objetivo realizar a caracterização química de extratos da espécie *Hibiscus sabdariffa* proveniente da cidade de Parnaíba, Piauí, bem como verificar atividades biológicas e avaliar a toxicidade dos mesmos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção dos materiais vegetais

As amostras nativas de *H. sabdariffa* foram coletadas na comunidade Chafariz, município de Parnaíba-PI (S02°53'18,90"/ W41°43'09,08"), em outubro de 2016 e as exsiccatas depositadas no herbário Delta (HDELTA) da Universidade Federal do Piauí, Campus Ministro Reis Velloso, sob número de tombamento 3594.

2.2 Produção dos extratos

Para obtenção dos extratos foram utilizados os solventes etanol e água, baseando-se no fato de que a maioria dos fitoconstituintes são solúveis em algum dos dois e principalmente por causa de suas toxicidades reduzidas quando comparados a outros solventes, tais como o metanol e o hexano por exemplo. Nesta etapa, seguiu-se a metodologia descrita por Miranda et al. (2015), onde os cálices e folhas foram inicialmente lavados em água corrente para retirada de impurezas, em seguida foram secos em estufa a 45 °C por 24 horas. Os materiais foram separadamente moídos para obtenção de um pó.

Foram pesados 5 g de pó de cada parte da planta e em seguida foram adicionados 50 mL de etanol ou água destilada, sendo as misturas agitadas magneticamente durante 24 horas e, em seguida, filtradas em filtro qualitativo (Nalgon®) de 3 micras. As amostras foram secas e concentradas até a obtenção de extratos aquosos (EAHSC e EAHSF) e etanólicos (EEHSC e EEHSF) de cálices e folhas respectivamente.

2.3 Determinação dos potenciais hidrogeniônicos dos extratos

Com um aparelho de determinação de pH, marca TECNAL® e modelo Tec-3MP, foram aferidos os extratos, em triplicata, até geração da leitura pelo equipamento, que converte diretamente o valor de potencial do eletrodo em unidades de pH.

2.4 Rendimento de extração

Para o cálculo de rendimento de extração foi utilizada a seguinte equação: $R (\%) = M_{\text{extrato}}/M_{\text{material vegetal}}$, onde $R (\%)$ é o rendimento em porcentagem da produção de extrato seco, M_{extrato} é a massa em gramas de extrato seco, $M_{\text{material vegetal}}$ é a massa em gramas de folhas ou cálices utilizada para extração.

2.5 Caracterização fitoquímica dos extratos

O estudo da constituição química das amostras foi realizado por meio de prospecção fitoquímica e obtenção de perfil cromatográfico por meio da técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

2.5.1 Prospecção fitoquímica

Para realizar o rastreamento dos fitoconstituintes dos extratos de *H. sabdariffa* foram utilizadas metodologia descritas por Matos (2009), adaptando-se o método com a preparação inicial de soluções estoques para cada um dos extratos com seus respectivos solventes extratores e concentração de 10 mg/mL. Todos os testes foram realizados em triplicata.

a) Fenóis e taninos

Fenóis e taninos foram rastreados por meio de teste utilizando o reagente de cloreto de ferro. Em tubos de ensaio foram adicionados 1 ml de cada extrato e 1 gota de solução aquosa de cloreto de ferro (FeCl_2) a 1% (m/v) e agitou-se. Para o teste em branco foi utilizado 1 ml de água destilada e uma gota da solução de FeCl_2 .

Qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado é considerado positivo quando comparado ao teste em branco.

b) Flavonoides por classes

Foram transferidos 3 mL de solução estoque de extrato para 3 tubos de ensaio (1 ml para cada um). Um dos tubos, então, foi acidificado a um pH 3 e os dois restantes foram alcalinizados a pH 8.5 e 11.

As antocianinas e antocianidinas em pH 3: adquirem cor vermelha, em pH 8, tornam-se lilás e em pH 11, adquirem coloração azul púrpura. Flavonas, flavonóis e xantonas: em pH 11 adquirem coloração amarela. Em pH 3 torna-se vermelha e em pH 11, vermelha púrpura. Os flavonóis em pH 11 adquirem aspecto vermelho alaranjado.

c) Polissacarídeos

Para verificação da presença de polissacarídeos nas amostras, 1 ml de solução estoque de cada um dos extratos foi transferido para tubos de ensaio e em cada um, foram adicionadas duas gotas de lugol. O escurecimento das amostras é sugestivo de resultado positivo.

d) Alcaloides

A verificação qualitativa da presença de alcaloides nas amostras de extratos foi realizada acrescentando-se 1 ml de solução estoque de cada extrato e 5 ml de solução de HCl a

5% em tubos de ensaio, em seguida foram adicionadas 5 gotas dos reativos de Bouchardat e Dragendorff. Em caso de reação positivo, há formação de precipitado laranja avermelhado (reativo de Bouchardat) ou de precipitado vermelho tijolo (reativo de Dragendorff).

e) Ácidos orgânicos

A presença de ácidos orgânicos nas amostras foi evidenciada transferindo-se 2 mL da solução estoque de cada extrato para tubos de ensaio e acrescentando-se uma gota do reativo de Pascová. A descoloração do reativo é evidência de reação positiva.

f) Açúcar redutor

Para o teste de presença de açúcares redutores nos extratos, transferiu-se 2,5 mL das soluções estoque de cada extrato para tubos de ensaio, adicionou-se 1 mL do reativo Fehling A e 1 mL do reativo Fehling B. As soluções foram aquecidas por cinco minutos em banho maria em ebulição. O aparecimento de precipitado vermelho tijolo indica presença de açúcares redutores.

g) Saponinas espumílicas

Dilui-se 5 mL das soluções estoque de cada extrato para 15 mL com água destilada em tubos Falcon e agitou-se vigorosamente por 2 minutos. O aparecimento de espuma e a estabilidade da mesma por mais de trinta minutos evidencia a presença de saponinas espumílicas nas amostras.

2.5.2 Perfil cromatográfico

As análises cromatográficas foram realizadas utilizando cromatógrafo líquido de alta eficiência (Shimadzu[®], Tóquio – Japão) híbrido equipado com sistema binário de bombas LC-6AD, um desgaseificador DGU-20A5, detector UV-vis SPD-20A e um controlador CBM-20A. Foi utilizada nos ensaios uma coluna cromatográfica Phenomenex[®]-Luna C18 (250 mm x 4,6 mm x 10 µm) e o software LC solution Release[®] 1.24 SP1.

Os extratos foram preparados em concentração de 10 mg/mL utilizando-se como solvente metanol a 0,2% (v/v) de ácido fosfórico. Uma alíquota foi filtrada em membrana de 0,45µm (*Chromafil[®] Xtra*) e 20 µL foram mantidas como o volume de injeção em todas as

análises. Os comprimentos de onda de leitura utilizados foram de 290 e 329 nm, proveniente do estudo de espectro de varredura realizado em espectrofotômetro Shimadzu®-1800/UV-Vis-Spectrophotometer na faixa de 190 a 1100 nm.

As condições de análise envolveram a utilização de uma fase móvel contendo uma mistura dos solventes, sendo a bomba A composta por água Milli-Q® a 0,1% (v/v) de ácido fórmico e a bomba B por metanol a 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético. O gradiente utilizado foi 100% de A e 0% de B até 0% de A e 100% de B por 40 minutos e de 40 a 55 minutos, de 0% de A e 100% de B até 100% de A e 0% de B. A vazão utilizada foi de 0.8 mL min⁻¹.

2.6 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

As análises de espectroscopia na região do infravermelho foram realizadas em espectrômetro Shimadzu IRAffinity-1S®, na faixa espectral de 4000-700 cm⁻¹ de resolução, pela técnica ATR (*Attenuated Total Reflectance*). Foram realizadas 45 scans em cristal de seleneto de zinco para a identificação dos grupos funcionais presentes nos extratos de *H. sabdariffa*.

2.7 Determinação do teor de compostos fenólicos totais

Os valores de compostos fenólicos totais das amostras foram determinados por um ensaio colorimétrico baseado em procedimentos descritos por Singleton e Rossi (1965) com modificações, baseado no reagente Folin-Ciocalteu, que reage com fenóis reduzidos, produzindo, assim, um produto azul estável no final da reação. Para a mistura reacional utilizou-se em 25 µl de amostra ou solução padrão, 75 µl de água ultrapura e 25 µl de reagente Folin®-Ciocalteu. Após 6 minutos, foram adicionados 100 µl de Na₂CO₃ (75 g/l). A absorbância foi medida a 765 nm, após incubação durante 90 minutos à temperatura ambiente. Para a construção da curva de calibração utilizou-se ácido gálico (AG) em concentrações que variaram de 10 a 200 µg de AG/mL de água e os resultados foram expressos como µg equivalentes de ácido gálico (AGE)/mg de amostra. As quantificações foram realizadas em triplicata.

2.8 Determinação do teor de flavonoides

Os valores de flavonoides das amostras foram determinados por um ensaio colorimétrico baseado em procedimentos descritos por Zhishen, Mengcheng e Jianming (1999) com modificação, baseado na formação de composto de flavonoide-alumínio. Resumidamente, 25 µL de amostra foram misturados com 100µL de água ultrapura e 10 µL de solução de NaNO₂

a 5%. Após 5 minutos, adicionou-se 15 µL de solução de AlCl₃ a 10%. Após 1 minuto (6 minutos após adição da amostra), adicionaram-se 50 µL de NaOH 1 mol/L. A solução foi homogeneizada por 30 segundos, e a absorbância foi lida a 593 nm. A epicatequina foi usada para traçar a curva padrão variando de 15 a 300 µg/mL em água, e os resultados foram expressos em µg de epicatequina (EEC)/mg de amostra. Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

2.9 Atividades biológicas dos extratos

2.9.1 Atividade antioxidante

a) Ensaio da atividade sequestrante de 2,2-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)

A capacidade antioxidante foi obtida pela determinação da capacidade de sequestro do radical livre ABTS^{•+} [2,2-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] de acordo com a metodologia proposta por Re et al. (1999) e modificada por Gião et al. (2007). Nesta técnica há produção direta do cromóforo (azul/verde) por meio da reação entre ABTS e persulfato de potássio. A solução de ABTS^{•+}, foi preparada através da adição, a 1:1 (v/v), de 7 mmol/l de solução de sal de ABTS^{•+} (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) a 2,45 mmol/l de soluções de persulfato de potássio.

Utilizou-se um volume preciso de cada amostra para obter uma porcentagem de inibição entre 20 e 80%, por 6 min de reação, com 1 mL de solução ABTS^{•+} a partir da fórmula $PI (\%) = (Abs_{ABTS^{•+}} - Abs_{amostra}/Abs_{ABTS^{•+}}) \times 100$, onde PI (%) representa a porcentagem de inibição, Abs_{ABTS^{•+}} corresponde à absorbância inicial do ABTS^{•+} diluído e Abs_{amostra} refere-se à absorbância da amostra após 6 minutos de reação. As leituras foram realizadas em em espectrofotômetro 6405/UV-Vis-Spectrophotometer[®] (Jenway, United Kingdom) a 734 nm em triplicata. Foi utilizada curva de calibração previamente preparada com ácido ascórbico como padrão ($y = 444,42x + 1,8098$, $R^2 = 0,999$), o resultado final foi expresso como concentração equivalente de ácido ascórbico (AAE).

b) *Ensaio da atividade sequestrante de 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH)*

A atividade antioxidante das amostras foi determinada espectrofotometricamente a 517 nm contra o radical de azoto estável DPPH[•]. O radical livre DPPH[•] é reduzido à hidrazina correspondente, quando reage com doadores de hidrogênio, tais como um antioxidante. Nesta técnica, 25 µl da amostra foram misturadas com 200 µl de solução etanólica de 10⁴ mol/l de DPPH[•]. A mistura, agitada vigorosamente, foi deixada em repouso durante 30 min no escuro (até valores de absorção estáveis) e determinada em espectrofotômetro 6405/UV-Vis-Spectrophotometer® (Jenway, United Kingdom) a 517 nm. A curva de calibração foi preparada com Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) ($y = - 0,00161x + 0,871$, $R^2 = 0,996$) e os resultados foram expressos como equivalentes de Trolox.

c) *Potencial antioxidante de redução férrica (FRAP)*

O ensaio FRAP é caracterizado pela redução do complexo férrico ao estado ferroso pela ação de um composto antioxidante, em meio ácido, (pH ~ 3,6), de forma a manter a solubilidade do ferro (MAGALHÃES et al., 2008). As determinações foram obtidas pela adição de 20 µl de amostra a 180 µl de reagente FRAP (Fe³⁺ + 2,4,6-Tri (2-piridil)-s-triazina) e a absorbância foi medida em espectrofotômetro 6405/UV-Vis-Spectrophotometer® (Jenway, United Kingdom) a 593 nm. A curva de calibração foi preparada com ácido ascórbico ($y = 0,0121x + 0,1262$, $R^2=0,970$) e os resultados foram expressos como equivalentes de ácido ascórbico (AAE). Todas as medidas foram realizadas em triplicata.

2.9.2 Atividades antimicrobiana e antiparasitária

a) *Atividade antibacteriana*

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada por meio do método de difusão em ágar, com utilização de poços conforme atualizações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2012), onde os extratos foram testados na concentração de 20 mg/mL para bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella typhimurium* ATCC 1401).

Os microrganismos utilizados no ensaio foram repicados em placas com ágar Mueller-Hinton por meio do método de esgotamento e incubados em estufa bacteriológica em aerobiose, a uma temperatura de 37 °C por 24 horas.

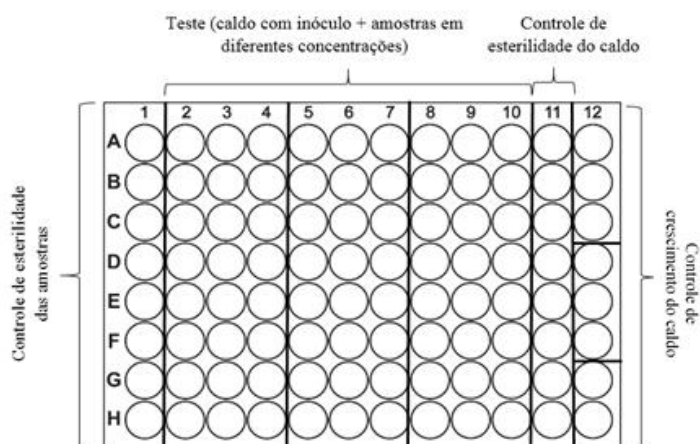
As suspensões bacterianas ($1-2 \times 10^8$ UFC/mL) foram preparadas em solução salina estéril a 0,9% e semeadas em placas com ágar Mueller-Hinton (HIMEDIA) com auxílio de um swab estéril e realizou-se perfurações de 6 mm, onde foram adicionados 100 µL dos extratos. Os aquosos (EAHSC e EAHSF) foram solubilizados em água destilada e os etanólicos (EEHSC e EEHSF) em água e dimetil-sulfóxido (DMSO 10% v/v). As placas foram incubadas nas mesmas condições citadas anteriormente.

Os resultados foram interpretados a partir da verificação e medição do diâmetro da zona sem crescimento microbiano ao redor dos poços.

b) Atividade antifúngica

A atividade antifúngica foi avaliada utilizando-se o método de microdiluição em caldo preconizado pelo documento M27-A3 do CLSI contra o fungo *Candida albicans*. A suspensão do microorganismo foi preparada em solução salina a 0,85% a uma concentração de $1-3 \times 10^3$ UFC/mL. O fungo foi inoculado em caldo RPMI-1640 tamponado com MOPS (ácido morfolinopropanosulfônico) e adicionou-se os extratos diluídos em água destilada com concentrações variando de 5000 a 39 µg/mL, de acordo com o desenho experimental demonstrado na figura 1. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas em condições aeróbicas. O ensaio foi realizado em triplicata.

Figura 1. Desenho experimental para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos aquosos e etanólicos de *Hibiscus sabdariffa* frente ao fungo *C. albicans*.



Fonte: Autoria própria (2018)

c) Avaliação *in vitro* da atividade antileishmania

O ensaio foi realizado com formas promastigotas da espécie *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH-8) em fase logarítmica de crescimento de acordo com metodologia descrita por Carneiro et al. (2012). Os parasitas foram semeados em placas de cultivo celular de 96 poços contendo meio Schneider's suplementado (10% de SFB, 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina), na quantidade de 1×10^6 de *leishmanias* por 100 µL de meio. Em seguida, os extratos (diluídos em DMSO) foram adicionados aos poços em triplicata e realizou-se diluições seriadas até se atingir as oito faixas de concentrações finais desejadas (800 a 6,25 µg/mL).

As placas foram incubadas em estufa a temperatura de 26°C por 48h e, 6h antes do término deste período, foram adicionados 20 µL de resazurina 1×10^{-3} mol/L, quando se incubou novamente a placa. A leitura da placa foi realizada num leitor de placas de absorvância Biotek (modelo ELx800), no comprimento de onda de 550 nm e os resultados foram expressos em termos de porcentagem de inibição do crescimento.

O controle positivo foi realizado com 2 µg/mL de Anfotericina B diluído em meio Schneider's contendo 1×10^6 promastigotas por poço. Já o controle negativo equivaleu ao meio Schneider's contendo 1×10^6 promastigotas por poço e, neste caso, a viabilidade será de 100% para o parasita. A leitura do branco, para cada concentração e para os controles fez-se necessária para desprezar a absorvância resultante do próprio meio com interferência ou não dos compostos estudados (SOARES et al., 2007; VALADARES et al., 2011).

Os dados foram expressos como média \pm desvio padrão ou erro padrão de três experiências independentes, tabelas e figuras. As representações gráficas foram obtidas com o software OriginPro[®] 8.

Todos os ensaios antileishmania foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. A concentração inibitória média (CI₅₀) com limite de confiança de 95% foi calculada utilizando regressão de probitos do programa SPSS[®] 13.0. Foram realizadas análises de variância ANOVA seguida pelo Teste de Bonferroni, através do programa *GraphPad Prism*[®] versão 5.0, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível máximo de significância estatística.

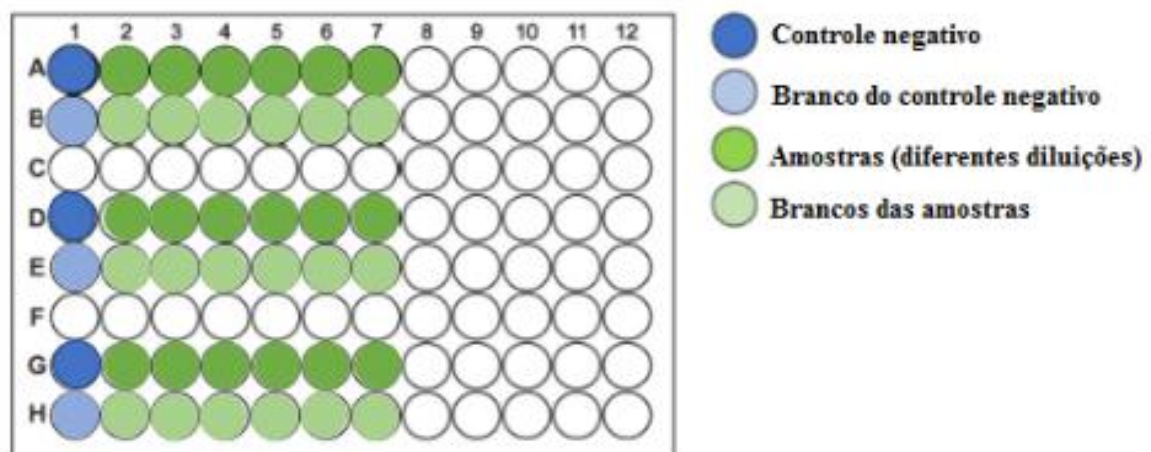
2.9.3 Ensaio *in vitro* de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE)

Os extratos foram testados para suas atividades inibitórias de AChE em concentrações que variaram para cada extrato, utilizando-se diluições seriadas de razão dois e foram

dissolvidos em tampão A (50mM Tris-HCl, pH 8) com 10% de metanol ou DMSO, seguindo o método espectrofotométrico desenvolvido por Ellman et al. (1961). Dividiu-se uma placa de 96 poços de acordo com a figura 2, onde foram adicionados em cada poço: 25 µL de soluções aquosas de iodeto de acetilcolina (ATCI) (15 mM), 125 µL de Reagente de Ellman (DTNB 3mM em Tampão C - 50mM Tris-HCl, pH 8 com 0,1 M NaCl e 0,02 M MgCl₂.6H₂O), 50 µL de Tampão B (50mM Tris-HCl, pH 8 com 0,1% albumina), 25 µL de amostras e 25 µL de AChE. Foram feitos poços para os brancos de cada concentração de amostra e controle, onde foram adicionados todos os componentes, exceto as enzimas. As amostras foram monitoradas a 405 nm 6 vezes a cada 2 minutos. O ensaio foi realizado em triplicata.

A porcentagem de inibição foi calculada utilizando-se a seguinte equação: % inibição = $(\text{declive}_{C-Cb} - \text{declive}_{A-Ab}) / (\text{declive}_{C-Cb})$, onde declive_C , declive_{Cb} , declive_A e declive_{Ab} são as cinéticas de inibição do controle branco do controle, amostras e branco das amostras, respectivamente. A concentração do extrato que inibiu a atividade enzimática em 50% (CI₅₀) foi determinada por uma análise de regressão linear entre as porcentagens de inibição em relação às concentrações do extrato utilizando o programa Excel®.

Figura 2. Desenho experimental do ensaio *in vitro* de inibição da enzima acetilcolinesterase.



Fonte: Adaptado de Grosso (2017)

2.9.4 Atividade hemolítica

Foi investigada a possível capacidade dos extratos de *H. sabdariffa* causarem lesões diretas à membrana plasmática de eritrócitos baseando-se em método descrito por Marani et al. (2015). Para isso, sangue de um doador voluntário saudável foi coletado em tubo contendo anticoagulante e os eritrócitos foram lavados 3 vezes em solução salina (NaCl 0,85%) por

centrifugação (3000 rpm/15 min) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos a 2,5%.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Cada poço, a partir da fileira B recebeu 150 µL da solução salina. Na fileira A, os poços receberam 300 µL de solução de solução de cada extrato em triplicata partindo de uma solução mãe de 10 mg/mL em salina (0,85%), em seguida foi retirado 150 µL de cada poço da fileira A e realizou-se diluições seriadas de razão 2 para cada fileira vertical de modo que as concentrações variaram de 0,039 a 5 mg/mL. Em seguida, foram plaqueados em todos os poços 150 µL de suspensão de eritrócitos. Para o controle positivo utilizou-se a mesma proporção de salina/Triton X (concentração). Após incubação de 30 minutos em estufa à temperatura de 36 °C, as amostras foram centrifugadas (5000 rpm por 1 min) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância no leitor de microplacas (Bioeasy®) a 492 nm.

Os resultados de porcentagem de hemólise foram obtidos por meio da fórmula: Hemólise (%) = $\frac{Abs_{amostra} - Abs_{Scnegativo}}{Abs_{Scpositivo} - Abs_{Scnegativo}}$, onde $Abs_{Scnegativo}$ representa a absorbância da salina e $Abs_{Scpositivo}$ indica a absorbância do Triton. Os resultados foram expressos em concentração efetiva capaz de hemolisar 50% das hemácias (CH_{50}) que foi calculada utilizando-se equações da reta ($y = ax+b$) obtidas por meio de regressão linear com coeficientes de correlação próximos a 1 ($R^2 = 0,97 - 0,99$), de acordo com a metodologia descrita por Brien-Simpson et al. (2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Rendimento de extração e potencial hidrogeniônico dos extratos

As porcentagens do rendimento de extração e os valores de pH obtidos para os extratos de *H. sabdariffa* estão expressos na tabela 1.

De acordo com os valores de pH obtidos, todos os extratos apresentaram perfil ácido e verificou-se uma sutil diferença nos valores de acordo com as partes da planta utilizadas, onde os extratos de cálices apresentaram-se levemente mais ácidos que os das folhas. Comparando os solventes de extração não houve grandes diferenças nos valores de pH para ambas as partes.

Sobota et al. em 2016 obtiveram resultados semelhantes quanto aos valores de pHs de extratos aquosos (1,8) e etanólicos (2,6) de cálices de *H. sabdariffa*. Para as folhas, valores semelhantes foram encontrados tanto para extrato aquoso com valor de 3,2 (PUTSHAK'A et

al., 2013) quanto para alcoólicos com valores que variaram de 2,8 a 3,6 (MEYER, CHAUHAN e MACDONALD, 2016).

Provavelmente, os perfis ácidos exibidos pelos extratos derivam da grande quantidade de compostos ácidos, tais como o ácido protocatecuico, ácido cítrico e ácido málico presentes nessa espécie (VILLANI et al., 2013) e, possivelmente, os teores de ácidos orgânicos em extratos de folhas são menores que os de cálices, visto que esses apresentam, geralmente, valores de pH mais baixos.

Tabela 1. Porcentagem de rendimento de extração e valores de pH para extratos etanólicos e aquosos de *Hibiscus sabdariffa* L.

Parte da planta	Extratos	Rendimento (%)	pH
Cálices	EEHSC	18,0 ± 3,45	2,4 ± 0,05
	EAHSC	13,8 ± 10,72	2,4 ± 0,1
Folhas	EEHSF	19,1 ± 3,50	3,3 ± 0,15
	EAHSF	14,2 ± 9,61	3,1 ± 0,06

EEHSC: extrato etanólico de cálices; EEHSF: extrato etanólico de folhas; EAHSC: extrato aquoso de cálices; EAHSF: extrato aquoso de folhas. Fonte: Autoria própria (2016)

Segundo Melecchi (2005), que comparou diferentes métodos de extração para uma espécie do mesmo gênero, extrações que utilizam solventes menos polares apresentam rendimentos superiores aos solventes mais polares, como ficou evidenciado nesse estudo, onde os extratos etanólicos apresentaram rendimentos muito superiores aos aquosos.

Sobota e colaboradores (2016), ao realizarem extração de cálices da espécie, obtiveram resultado semelhante para o extrato alcoólico, embora um pouco superior (19%), mas obtiveram rendimentos bem superiores para o extrato aquoso (46,2%), o que pode sugerir que o solvente utilizado não é a única variável que influencia no rendimento da extração. Outros fatores tais como temperatura, tempo de extração, velocidade de agitação, bem como alguns intrínsecos à cada um dos extratos também podem interferir nesse rendimento (OLIVEIRA et al., 2016).

3.2 Prospecção fitoquímica dos extratos

Na tabela 2 estão demonstrados os resultados obtidos a partir dos testes de detecção qualitativos de compostos fitoquímicos nos extratos de *H. sabdariffa* produzidos.

Tabela 2. Resultados para a prospecção fitoquímica realizada para extratos etanólicos e aquosos de *Hibiscus sabdariffa* L.

Testes	Cálices		Folhas	
	EEHSC	EAHSC	EEHSF	EAHSF
Fenóis e Taninos	+	+	+	+
Antocianinas e antocianidinas	-	+	-	-
Flavonas, flavonóis e xantonas	+	+	+	+
Alcaloides	+	-	+	-
Polissacarídeos	+	+	+	+
Ácidos orgânicos	+	+	+	+
Açúcares redutores	-	-	-	+
Saponinas	-	-	-	-

EEHSC: extrato etanólico de cálices; EEHSF: extrato etanólico de folhas; EAHSC: extrato aquoso de cálices; EAHSF: extrato aquoso de folhas. (+) Positivo (-) Negativo. Fonte: Autoria própria (2017)

A partir dos resultados, foi possível verificar que os extratos apresentaram perfis semelhantes, embora exista algumas diferenças na presença de alguns compostos dependendo do solvente de extração utilizado e das partes da planta. Fenóis, taninos, flavonas, flavonóis, xantonas, polissacarídeos e ácidos orgânicos estiveram presentes em todos os extratos. Açúcares redutores somente foram encontrados em EAHSF.

Antocianinas e antocianidinas foram encontradas somente no extrato aquoso de cálice, mas há relatos da presença desses compostos em extratos etanólicos de folhas da espécie (MUNGOLE e CHATURVEDI, 2011). A pequena quantidade desses compostos nas folhas e a limitação do teste realizado para determinação de alguns constituintes em solventes menos polares podem ter sido os interferentes para o resultado obtido.

Alcaloides somente foram encontrados nos extratos etanólicos de ambas as partes, corroborando com os resultados encontrados por Mungole e Chaturved (2011) que demonstrou a presença dos compostos em extrato de folhas de *H. sabdariffa* e por Okerere, Iroka e Chukwuma (2015) que também verificaram a ausência desses compostos em extratos aquosos de cálices da e a presença em extratos etanólicos da mesma espécie.

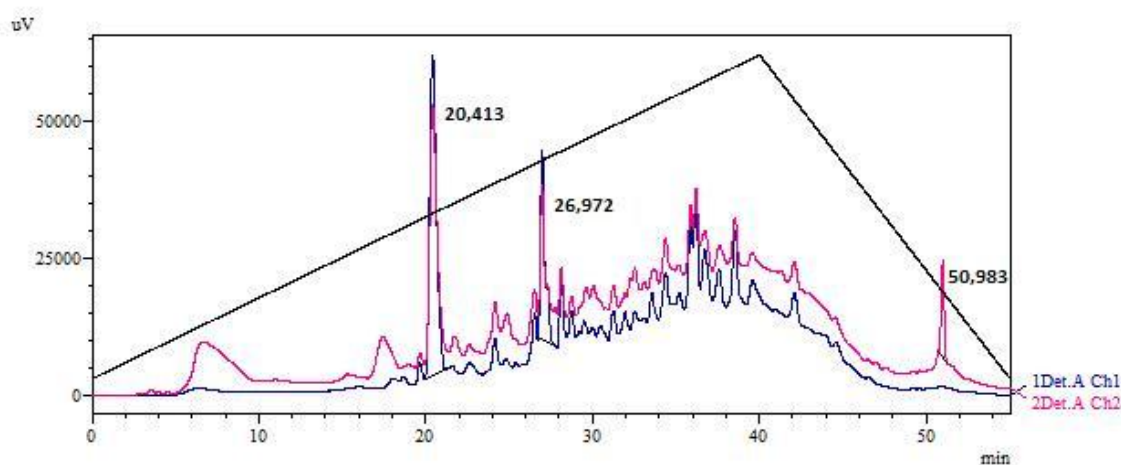
Os resultados encontrados estão de acordo com estudos sobre a mesma espécie já realizados, onde também foram relatadas a presença de compostos fenólicos, antocianinas, flavonoides, alcaloides e polissacarídeos em extratos aquosos e etanólicos de diferentes partes de *H. sabdariffa* (MUNGOLE; CHATURVEDI, 2011; OBOUAYEBA et al., 2014).

3.3 Perfil cromatográfico dos extratos

O método utilizado foi adequado para o isolamento dos principais compostos das amostras e indicou variações nos tempos de retenção, quantidade e intensidades dos picos exibidos pelos diferentes extratos.

Apenas EAHSF, devido à presença de grande quantidade de compostos, não apresentou todos os picos totalmente resolvidos, mas ainda assim exibiu três majoritários, como pode ser observado na figura 3. Chiu et al. (2015) em análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) de extratos aquosos de folhas da espécie também verificaram três picos majoritários e identificaram os mesmos em ordem decrescente de intensidade como sendo ácido elágico, epigalocatequina e catequina. Provavelmente, os três picos identificados em EAHSF estejam relacionados às mesmas substâncias.

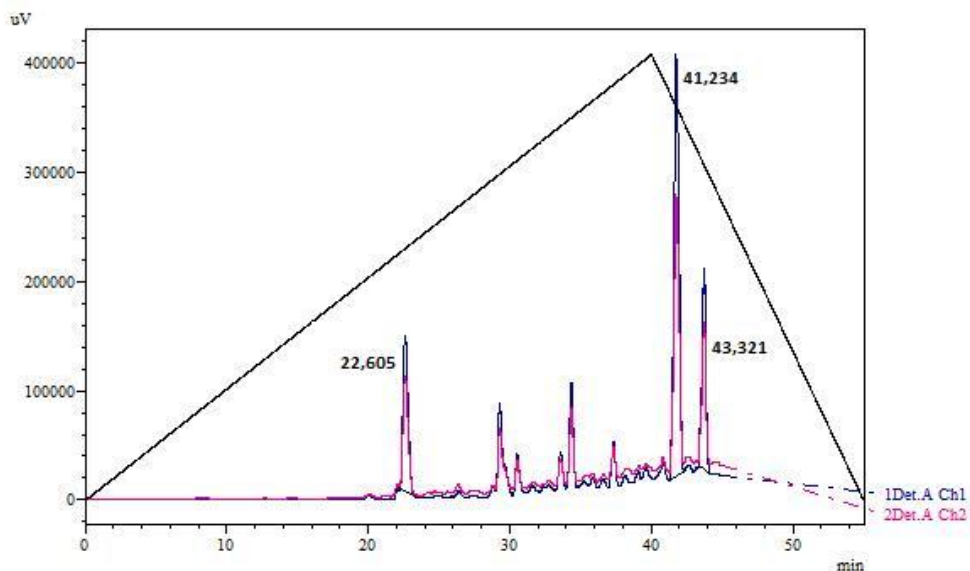
Figura 3. Perfil cromatográfico (CLAE/UV, 290 nm - azul e 329 nm - rosa) de extrato aquoso de folhas de *Hibiscus sabdariffa* (EAHSF) com identificação dos tempos de retenção dos picos majoritários.



Fonte: Autoria própria (2018)

Wang e colaboradores (2014) identificaram as três substâncias majoritárias em extratos hidrometanólicos de folhas de *Hibiscus sabdariffa*, sendo elas em ordem decrescente de intensidade de pico (isoquercitrina, ácido clorogênico e rutina). O presente estudo também encontrou três substâncias majoritárias em EAHSF, como demonstrado na figura 4, que possivelmente estão relacionadas àquelas, visto as polaridades mais próximas dos solventes de extração majoritários.

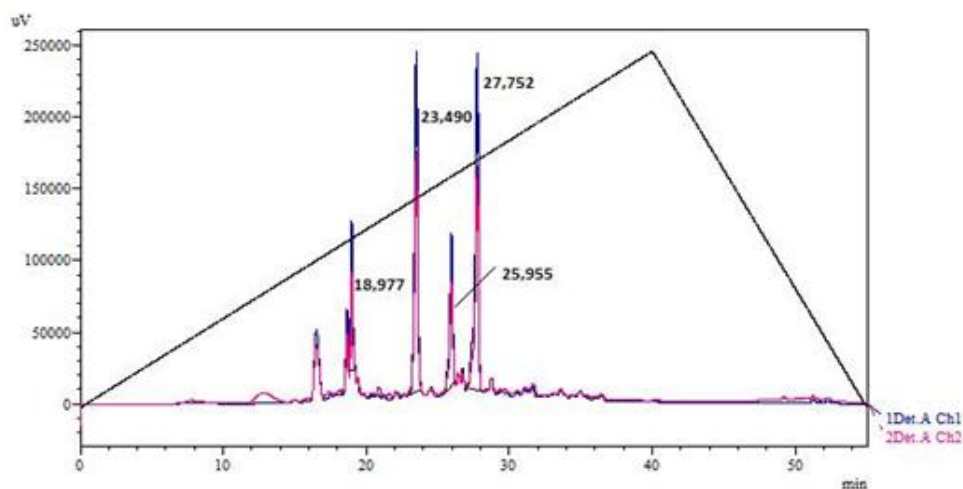
Figura 4. Perfil cromatográfico (CLAE/UV, 290 nm - azul e 329 nm - rosa) de extrato etanólico de folhas de *Hibiscus sabdariffa* (EEHSF) com identificação dos tempos de retenção dos picos majoritários.



Fonte: Autoria própria (2018)

Oboh et al. (2018), utilizando metodologia bastante similar ao do presente estudo identificou alguns compostos isolados de extrato metanólico de cálices da espécie. O perfil cromatográfico do presente estudo (figura 5) apresentou-se bastante similar àquele, inclusive em relação aos tempos de retenção, sugerindo que as substâncias majoritárias encontradas nesse extrato sejam o ácido clorogênico, catequina e rutina.

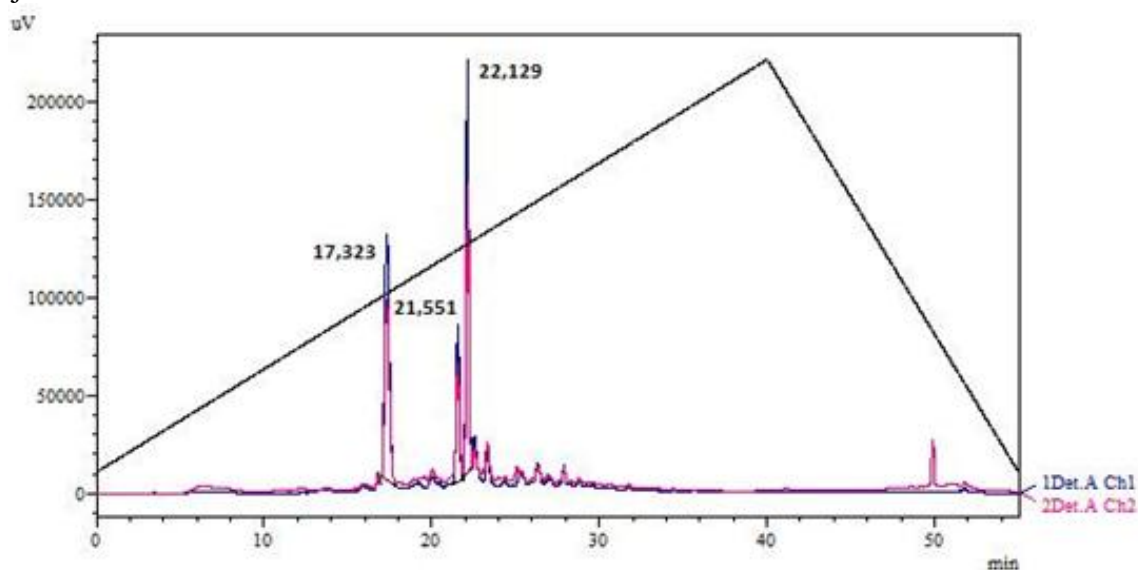
Figura 5. Perfil cromatográfico (CLAE/UV, 290 nm - azul e 329 nm - rosa) de extrato etanólico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* (EEHSC) com identificação dos tempos de retenção dos picos majoritários.



Fonte: Autoria própria (2018)

Sindi, Marshall e Morgan (2014) também analisando extratos aquosos de cálices de *H. sabdariffa* identificou, por meio de análise por espectrometria de massas, duas substâncias majoritárias como sendo as antocianinas delphinidina-3-sambubioside e cianidina-3-sambubioside, o que demonstra a possibilidade de que os componentes majoritários isolados em EAHSC (figura 6) sejam tais substâncias.

Figura 6. Perfil cromatográfico (CLAE/UV, 290 nm - azul e 329 nm - rosa) de extrato etanólico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* (EAHSC) com identificação dos tempos de retenção dos picos majoritários.



Fonte: Autoria própria (2018)

3.4 Quantificação dos teores de compostos fenólicos e flavonoides

Os compostos fenólicos são estruturas químicas que apresentam hidroxilas e anéis aromáticos, nas formas simples ou como polímeros. Tais compostos podem estar em formas livres ou complexadas a açúcares e proteínas em plantas e muitos desses metabólitos secundários estão relacionados a atividades biológicas de extratos vegetais, como por exemplo, as propriedades antioxidantes (ANGELO; JORGE, 2007).

Na tabela 3 estão expressos os resultados da quantificação de compostos fenólicos e flavonoides encontrados nos extratos produzidos.

Tabela 3. Teores de compostos fenólicos e flavonoides presentes nos extratos de *Hibiscus sabdariffa*.

Parte da planta	Extratos	Compostos fenólicos	
		totais ($\mu\text{g EAG/mg}$ extrato)	Flavonóides (μg EEC/mg extrato)
Cálices	EEHSC	$31,06 \pm 1,11$	$8,34 \pm 0,84$
	EAHSC	$24,86 \pm 2,44$	$5,38 \pm 1,09$
Folhas	EAHSF	$12,32 \pm 0,87$	$11,51 \pm 0,60$
	EEHSF	$13,67 \pm 0,95$	$36,88 \pm 1,47$

EEHSC: extrato etanólico de cálices; EEHSF: extrato etanólico de folhas; EAHSC: extrato aquoso de cálices; EAHSF: extrato aquoso de folhas. Fonte: Autoria própria (2017)

Pode-se observar que os extratos de cálices apresentaram maiores concentração de compostos fenólicos que os extratos de folhas. O EEHSC exibiu maior teor de compostos fenólicos totais, seguido por EAHSC. O extrato que apresentou menor teor de compostos fenólicos totais foi o EAHSF.

Os teores de compostos fenólicos encontrados no presente estudo tanto para os extratos aquosos quanto para os etanólicos de cálices de *H. sabdariffa* foram próximos aos encontrados por Obouayeba et al. (2015) onde o teor desses compostos foi de $23,21 \pm 2,70$ em extratos hidroalcoólicos de cálices da espécie. Já os teores encontrados por Mohd-esa e colaboradores, (2010), diferiram bastante dos encontrados nesse estudo. Os valores foram bem inferiores, sendo que os extratos aquosos de cálices e folhas apresentaram teores de $1,85 \pm 0,11$ e $1,71 \pm 0,04$ respectivamente. Os extratos alcoólicos desse mesmo estudo foram obtidos com 80% de metanol, para os quais encontraram-se os teores de compostos fenólicos de $2,91 \mu\text{g EAG/mg}$ extrato $\pm 0,07$ para extratos de cálices e de $2,20 \mu\text{g EAG/mg}$ extrato $\pm 0,02$ para os foliares.

ZHEN e colaboradores (2016) quantificaram o teor de compostos fenólicos de extratos de folhas de *H. sabdariffa* coletadas em vários países e obtidos com 70% de metanol e encontraram teores que variaram de $18,98 \pm 2,7$ a $29,9 \pm 0,5 \mu\text{gEAG/g}$ de extrato, portanto maiores que os do presente estudo para a mesma parte da planta.

Os flavonoides também são importantes constituintes fitoquímicos presente em extratos de *H. sabdariffa* e também estão bastante relacionados à atividade antioxidante. Os extratos foliares apresentaram maiores teores de flavonoides, quando comparados aos extratos de cálices. Resultado semelhante foi encontrado por Formagio et al. (2015) em extratos

metanólicos das mesmas partes da planta. Verificou-se também que o etanol extraiu melhor os flavonoides tanto dos cálices quanto das folhas, indo de encontro com dados apresentados por Do e colaboradores (2014), que realizaram um estudo para verificar os efeitos de diferentes solventes na extração de flavonoides e observaram que o etanol se destacou em relação à água nesse caso.

As variações encontradas na literatura para a determinação desses compostos em extratos da mesma espécie, possivelmente derivam da influência de alguns fatores, tais como a sazonalidade, a área geográfica e os métodos de extração utilizados no teor desses metabólitos (ANOKWURU et al., 2011; AL-RIMAWI et al., 2014; DO et al., 2014; ZHOU; ZHANG, 2017).

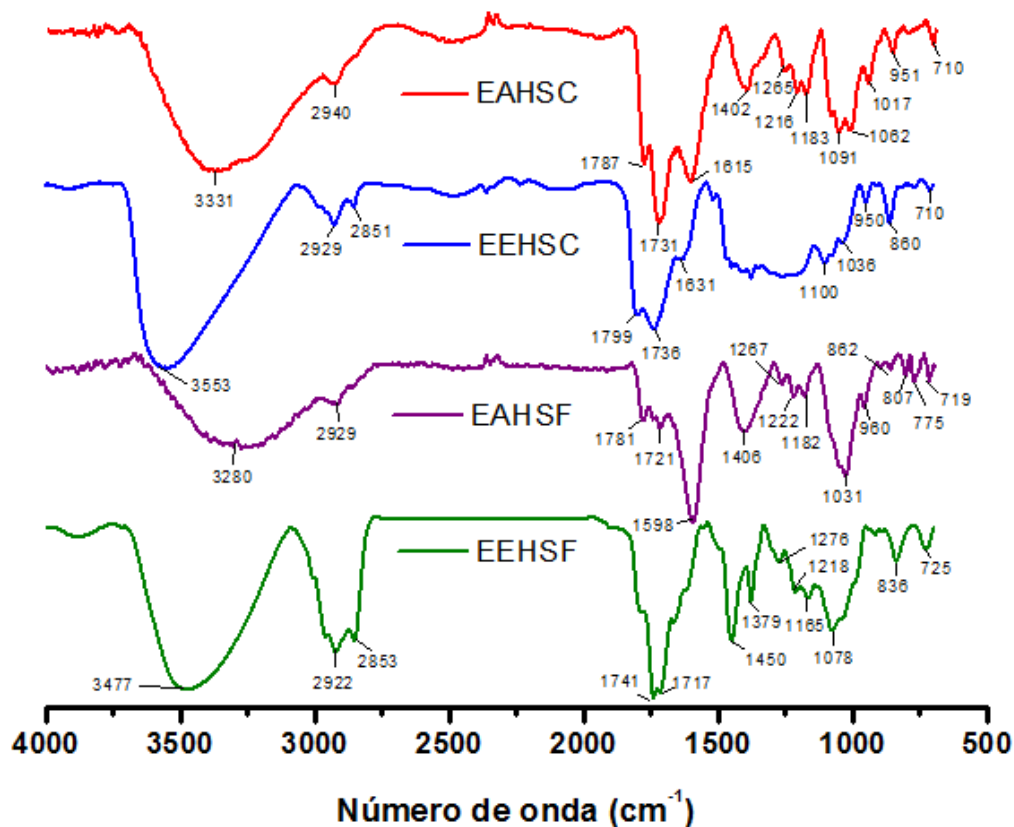
3.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Os resultados de espectro de absorção na região do infravermelho para os extratos de *H. sabdariffa* estão apresentados na figura 7.

Os espectros de FTIR dos extratos apresentam-se bastante semelhantes, tais quais os encontrados em outros estudos que também analisaram extratos de *H. sabdariffa* (EDDY et al., 2012; KUMAR, MANOJ e GIRIDHAR, 2015; (MOLINA-OCAMPO; VALLADARES-CISNEROS; GONZALEZ-RODRIGUEZ, 2015), salvo diferenças pontuais dependendo das condições de extração e das partes da planta.

De uma maneira geral, os espectros mostram a presença de uma banda larga na região de 2700 a 3600 cm^{-1} atribuída a ligações O – H resultantes de associação polimérica. As ligações C – H indicativas de anel aromático foram observadas para as bandas de estiramento entre 700 - 900 cm^{-1} . Na região entre 1721 – 1741 cm^{-1} , foram observadas bandas relacionadas à ligação C = O, atribuída a um grupo carbonila. A presença do grupo éter foi observado na faixa de 1062-1100 cm^{-1} (AMIR et al., 2013).

Figura 7. Espectros de absorção na região do infravermelho para extratos etanólicos (EEHSC e EEHSF) e aquosos (EAHSC e EAHSF) de cálices e folhas de *Hibiscus sabdariffa*, respectivamente.

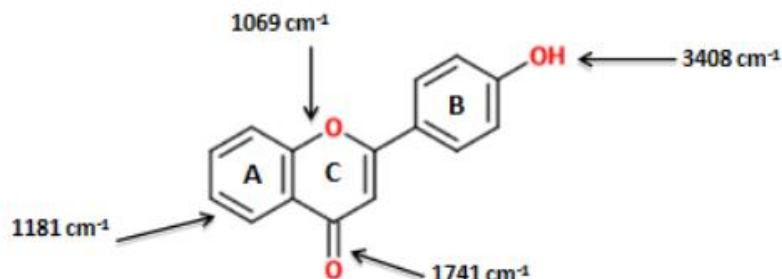


Fonte: Autoria própria (2018)

Entre os extratos, o EEHSF demonstra bandas de maior proximidade às regiões que são encontradas em compostos flavonoides, que possuem estrutura química como a observada na figura 8. O que corrobora com os resultados encontrados na determinação quantitativa de flavonoides em que esse extrato exibiu maior teor desses compostos.

O EAHSF exibe uma banda em 1031 cm^{-1} que não está presente ou está em baixa intensidade nos outros extratos, o que provavelmente decorre das ligações glicosídicas específicas nesse comprimento, o que corrobora com os resultados obtidos na prospecção fitoquímica que identificou a presença de açúcares redutores somente nesse extrato. Possivelmente EEHSC também apresenta tais compostos, porém em menor quantidade, visto que o mesmo exibiu uma banda de menor intensidade na mesma região.

Figura 8. Estrutura química geral dos flavonoides e os comprimentos de onda atribuídos aos principais grupamentos químicos contidos nesses compostos por espectroscopia na região do infravermelho.



Fonte: Molina-ocampo, Valladares-cisneros e Gonzalez-rodriguez (2015)

O EAHSC foi o único que exibiu banda no com de 1017 cm^{-1} , atribuída à deformação C-H do anel aromático de antocianinas, o que também corrobora com os resultados da prospecção fitoquímica do presente estudo, visto que somente esse extrato demonstrou a presença qualitativa desses compostos.

3.6 Atividades biológicas dos extratos

3.6.1 Atividade antioxidante

Os resultados obtidos a partir dos ensaios de determinação da atividade antioxidante dos extratos de *H. sabdariffa* por diferentes métodos estão expressos na tabela 4. Os padrões Trolox e ácido ascórbico são bastante utilizados para determinação de atividade antioxidante, visto que os mesmos possuem elevada atividade antioxidante. Portanto, maiores teores dos padrões nos extratos indicam maiores atividades antioxidante (POLJŠAK; RASPOR, 2008).

Tabela 4. Atividades antioxidantes determinadas por diferentes métodos de sequestro de radicais DPPH, ABTS e redução férrica (FRAP) de extratos de *Hibiscus sabdariffa* L.

Parte da planta	Extratos	DPPH (mg Trolox/g extrato)	ABTS (mg AAE/g extrato)	FRAP (mg AAE/g extrato)
Cálices	EEHSC	$18,48 \pm 0,76$	$71,6 \pm 2,2$	$22,06 \pm 0,12$
	EAHSC	$11,55 \pm 0,79$	$46,9 \pm 1,8$	$9,84 \pm 1,05$
Folhas	EEHSF	$33,27 \pm 2,87$	$154,2 \pm 2,8$	$45,33 \pm 1,26$
	EAHSF	$22,88 \pm 0,88$	$104,0 \pm 3,3$	$20,64 \pm 0,21$

EEHSC: extrato etanólico de cálices; EEHSF: extrato etanólico de folhas; EAHSC: extrato aquoso de cálices; EAHSF: extrato aquoso de folhas. Fonte: Autoria própria (2018)

Na literatura existem diversos trabalhos que relatam atividade antioxidante em extratos de *H. sabdariffa*, especialmente dos cálices (BORRÁS-LINARES et al., 2015; SOBOTA; PINHO; OLIVEIRA, 2016; MACIEL et al., 2018). Tal propriedade varia muito nessa espécie, o que pode ser devido a variáveis que influenciam os teores de compostos relacionados à atividade antioxidante em extratos vegetais, tais como origem geográfica da planta (WANG et al., 2014; ZHEN et al., 2016), adubação (RAMOS et al., 2011; FORMAGIO et al., 2015) e métodos de extração de compostos ativos (SOBOTA; PINHO; OLIVEIRA, 2016; MACIEL et al., 2018).

Verificou-se também que possivelmente exista uma relação entre os teores de flavonoides e as atividades antioxidantes obtidas nesse estudo, visto que os extratos em ordem decrescente de teores desses compostos (EEHSF, EAHSF, EEHSC e EAHSF) correlacionaram-se com a ordem decrescente das capacidades antioxidantes nas duas técnicas que tem como princípio o sequestro de radicais (DPPH e ABTS), assim como já observado em outro estudo com a mesma espécie (ANOKWURU et al., 2011).

Para a técnica de redução férrica, os extratos com maior e menor atividade antioxidante foram os mesmos dos outros métodos, corroborando também com os resultados de flavonoides. A mudança na ordem de capacidade antioxidante dos outros dois extratos nessa técnica possivelmente relaciona-se com a proximidade dos teores desses compostos em EAHSF e EEHSC e também com as limitações existentes nesse teste, tais como a interferência com compostos redox que mesmo sem possuir propriedades antioxidantes pode reduzir o Fe (III); o fato de que nem todos os compostos antioxidantes são capazes de reduzir o metal a uma taxa tão rápida que seja possível verificar durante o tempo do teste; a produção concomitante de Fe (II) que possui propriedades pró oxidantes (MAGALHÃES et al., 2008).

3.6.2 Atividade antimicrobiana e antiparasitária

a) Atividade antibacteriana

A resistência microbiana tornou-se um dos mais sérios e preocupantes problemas de saúde pública em todo o mundo. Portanto, cada vez mais busca-se novas substâncias que possam ter propriedades antibacterianas ou antifúngicas. Visto que tais potenciais são demonstrados empiricamente em várias espécies vegetais, muitas são as pesquisas que focam nessas plantas, a procura de antibióticos (DUARTE, 2006).

Não foram observadas zonas de inibição evidentes contra as estirpes bacterianas na concentração testada. Poucos são os estudos que já realizaram o teste de difusão em ágar para determinação da atividade antibacteriana em extratos de *H. sabdariffa*, mas há relatos de que extratos alcóolicos de cálices e folhas da espécie com concentrações menores que 20 mg/mL demonstraram efeitos inibitórios *in vitro* contra várias cepas bacterianas, incluindo *S. aureus* e *E. coli*, sendo que os extratos etanólicos apresentaram maior efeito antimicrobiano que aquosos (OLALEYE, 2007; DA-COSTA-ROCHA et al., 2014).

A ausência de atividade dos extratos de *H. sabdariffa* contra as bactérias testadas possivelmente pode ter sido devido a fatores, tais como o método de extração utilizado que podem ter influenciado a concentração de compostos bioativos responsáveis por tal propriedade nos extratos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007), os já citados fatores sazonais e genéticos relacionados à espécie (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014) e até mesmo o método empregado para a determinação da atividade antibacteriana. No caso do presente estudo, a metodologia empregada pode ter gerado uma falsa ideia de que o extrato não apresentava atividade, visto que a mesma vai depender da capacidade de difusão dos compostos no meio sólido, o que é muito variável entre extratos. Será necessário o emprego de método diferente para determinar a real capacidade antibacteriana dos extratos.

A literatura já descreve que os compostos fenólicos são considerados como ativos antimicrobianos, mas nem sempre, um alto teor total em compostos fenólicos, está correlacionado com a alta atividade antibacteriana. Borrás-linares et. al. (2015) observaram que extratos de *H. sabdariffa* com maior atividade antibacteriana, não exibiram o maior conteúdo desses compostos, o que possivelmente está relacionado à complexa composição dessas substâncias e a possível existência de efeitos sinérgicos ou antagonistas com outros compostos não fenólicos.

b) Atividade antifúngica

Os resultados obtidos para o ensaio de determinação de CIM dos extratos de *H. sabdariffa* estão expressos na tabela 5.

Houve crescimento fúngico em todos os poços, mesmo na maior concentração testada, o que possivelmente decorre dos teores de compostos envolvidos na atividade antifúngica, tais como os fenólicos não serem em quantidade suficiente para gerar a atividade antimicrobiana. São poucos os estudos que demonstrem atividade antifúngica de extratos de *H. sabdariffa*.

Tabela 5. Concentrações inibitórias mínimas de extratos de *Hibiscus sabdariffa* frente ao fungo *C. albicans*.

Parte da planta	Extratos	Concentração ($\mu\text{g/mL}$)
Cálices	EEHSC	>5000
	EAHSC	>5000
Folhas	EEHSF	>5000
	EAHSF	>5000

EEHSC: extrato etanólico de cálices; EEHSF: extrato etanólico de folhas; EAHSC: extrato aquoso de cálices; EAHSF: extrato aquoso de folhas. Fonte: Autoria própria (2018)

Rukayadi, Shim e Hwang (2008) encontrou resultados positivos para o extrato metanólico de frutos da espécie contra cepas de *C. albicans* em uma concentração, porém com uma concentração duas vezes maior que a utilizada no presente estudo. Ainda constataram que o extrato não se apresentou efetivo para outras espécies de *Candida*. Alshami e Alharbi (2014) também verificaram que o extrato aquoso de cálices apresentou alta potência (MIC < 2000 $\mu\text{g/mL}$) contra cepas clínicas de *C. albicans*, isoladas de infecções recorrentes do trato urinário.

c) Avaliação *in vitro* da atividade antileishmania

Os resultados desse estudo demonstraram pela primeira os efeitos de inibição *in vitro* de extratos etanólicos e aquosos de *H. sabdariffa* contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e estão apresentados na figura 9. O controle positivo Anfotericina B, na concentração testada (2 $\mu\text{g/mL}$) apresentou 89,95% \pm 0,07 de inibição de crescimento.

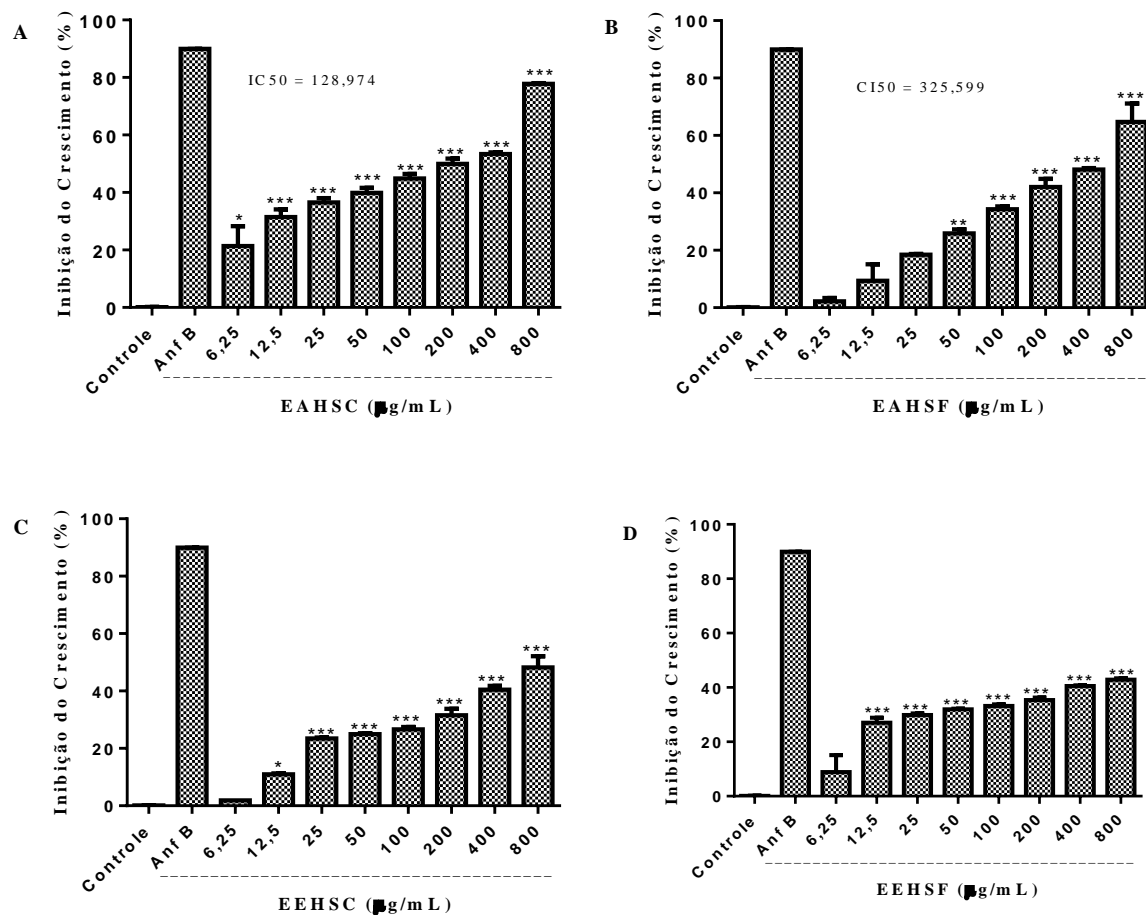
Verificou-se que os extratos aquosos de ambas as partes estudadas se destacaram na avaliação da capacidade antileishmania, no entanto, EAHSC (figura 9 - A) apresentou menor CI_{50} (128,974 $\mu\text{g/mL}$) e, portanto, maior atividade. EAHSF (Figura 9 - B) foi o segundo a apresentar melhor atividade ($\text{CI}_{50} = 325,599 \mu\text{g/mL}$).

Com relação aos extratos etanólicos, não foi possível calcular a CI_{50} , visto que na maior concentração testada, os mesmos apresentaram porcentagens menores de 50% de inibição. O EEHSC (figura 9 - C) se mostrou mais efetivo, pois na concentração de 800 $\mu\text{g/mL}$ demonstrou 48,18% de inibição, enquanto que EEHSF (figura 9 - D) na mesma concentração, exibiu 42,89% de atividade inibitória.

Os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides estão bastante relacionados com a atividade antileishmania de diferentes extratos vegetais (KAUR; KAUR, 2018;

ARÉVALO-LOPÉZ et al., 2018). Apenas o extrato EAHSC demonstrou a presença de antocianinas, como demonstrado nos resultados de prospecção fitoquímica e FTIR. Dessa forma, possivelmente a presença de tais compostos esteja relacionada à melhor eficácia desse extrato quando comparado aos demais, visto que já foi descrita uma relação direta entre o teor desses compostos e a atividade antileishmania (MANSOUR et al., 2013).

Figura 9. Atividade antileishmania de extratos aquosos (EAHSC e EEHSF) e etanólicos (EEHSC e EEHSF) de cálices e folhas de *Hibiscus sabdariffa* e do antibiótico Anfotecina B (Anf B). Os resultados estão representados por média \pm desvio padrão (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$).



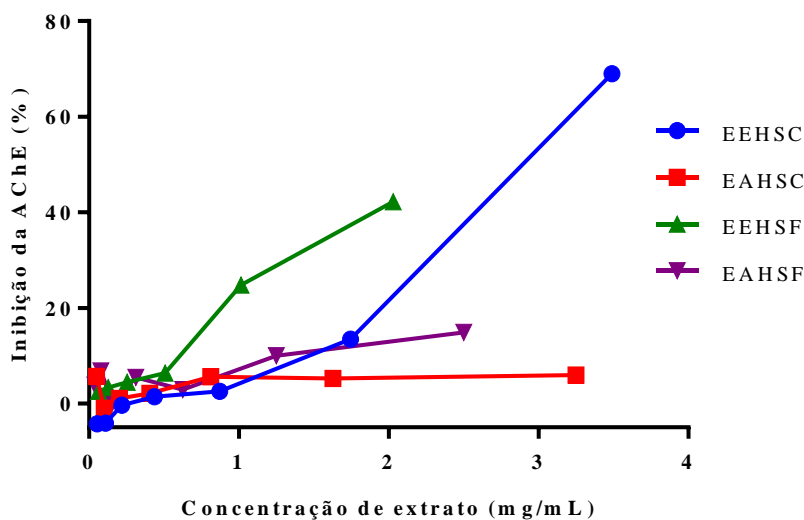
Fonte: Autoria própria (2017)

3.6.3 Ensaio *in vitro* de inibição da enzima acetilcolinesterase

O presente estudo demonstrou pela primeira vez por meio de ensaio *in vitro* a atividade de inibição de AChE de extratos aquosos e etanólicos de folhas e cálices de *H. sabdariffa*. Os

resultados estão expressos na figura 10. O EEHSC apresentou melhor porcentagem de inibição (69%) quando comparado aos outros extratos testados.

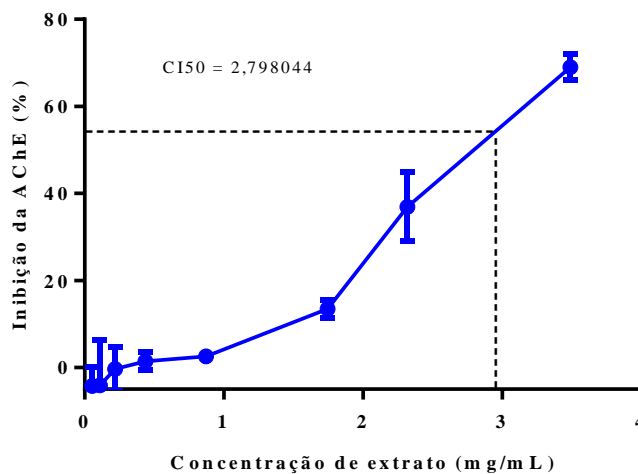
Figura 10. Porcentagens de inibição da atividade de AChE por extratos aquosos (EAHSC e EEHSF) e etanólicos (EEHSC e EEHSF) de cálices e folhas de *H. sabdariffa*.



Autoria própria (2018)

Devido a distância entre a porcentagem de inibição na maior concentração e na imediatamente anterior seguindo a diluição seriada para o EEHSC, foi feita uma diluição intermediária para ser possível calcular a concentração necessária para provocar 50% de inibição enzimática, que foi de 2,80 mg/mL como demonstrado na figura 11.

Figura 11. Porcentagens de inibição da atividade de AChE por extrato etanólico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* (EEHSC).



Fonte: Autoria própria (2018)

Alguns autores testaram extratos da espécie para verificação da mesma atividade. No entanto, os mesmos utilizaram extratos obtidos por diferentes rotas e com a utilização de solventes tóxicos. Seung e colaboradores (2016) testaram fração hexânica de cálices de *H. sabdariffa* e obtiveram uma resposta de 47,23% para a inibição da AChE numa concentração de 1 mg/mL. Em estudo semelhante, OBOH e colaboradores (2018) verificaram uma CI_{50} de 46,96 μ g/mL para extrato de cálices obtido com metanol e ácido clorídrico (HCl).

Alguns estudos correlacionam quantidades de compostos fenólicos totais em extratos com ação de inibição da enzima AChE, apoiando a ideia de que esses constituintes apresentem efeito neuroprotetor (PAPANDREOU et al., 2009; GIRONÉS-VILAPLANA et al., 2012). Essa correlação corrobora com os resultados desse estudo, em que o extrato com maior teor de compostos fenólicos foi o que possuiu melhor atividade de inibição enzimática. No entanto, a diferença de concentração entre EEHSC e EAHSC não foi tão grande e, no entanto, a atividade apresentou-se muito discrepante, o que sugere que a atividade também depende da interação com outros compostos não fenólicos.

OBOH e colaboradores (2018) realizaram a identificação dos compostos presentes em extrato de cálices obtido com metanol e HCl por meio de CLAE e confirmaram os compostos fenólicos possivelmente envolvidos nessa atividade (ácido clorogênico, rutina e catequina). O perfil de EEHSC apresentou-se bastante similar com o obtido pelos autores e possivelmente as mesmas moléculas são as responsáveis pela melhor resposta exibida pelo mesmo na inibição enzimática por esse extrato, visto os relatos de estudos anteriores sobre o potencial dessas moléculas na terapia de distúrbios neurodegenerativos (OBOH et al., 2016; OLASEHINDE; OLANIRAN; OKOH, 2017).

3.6.4 Atividade hemolítica

Os resultados para análise da citotoxicidade dos extratos de *H. sabdariffa* contra eritrócitos humanos estão expressos na tabela 6.

Pôde-se verificar que os extratos foliares apresentam-se mais tóxicos que os de cálices. Não há na literatura informações acerca dos efeitos tóxicos de extratos foliares de *H. sabdariffa*, mas alguns estudos *in vivo* já verificaram que extratos aquosos de cálices da espécie exibiram um efeito protetor contra o dano causado pelo estresse oxidativo provocado por ácido sulfúrico (H_2SO_2) em membranas plasmáticas de hemácias de camundongos saudáveis (MOHAMED; NOR; BUDIN, 2012) e com diabetes induzida por estreptozotocina (MOHAMED et al., 2013).

Também já foi constatado que extrato do cálice tem efeito hematoprotetor em casos de anemia e leucocitose induzida por tetracloreto de carbono (FAMUREWA; KANU; OGUGUA, 2015).

Tabela 6. Concentrações eficientes de extratos aquosos e etanólicos de *Hibiscus sabdariffa* para causar 50% de hemólise (CH₅₀).

Parte da planta	Extrato	CH ₅₀ (mg/mL)
Cálices	EEHSC	2,95 ± 0,06
	EAHSC	2,47 ± 0,27
Folhas	EEHSF	1,09 ± 0,09
	EAHSF	1,34 ± 0,14

EEHSC: extrato etanólico de cálices; EEHSF: extrato etanólico de folhas; EAHSC: extrato aquoso de cálices; EAHSF: extrato aquoso de folhas. Fonte: Autoria própria (2018)

Todos esses estudos relacionam essa atividade hematoprotetora com a presença nesses extratos de compostos antioxidantes, responsáveis por reduzir o estresse oxidativo e consequentemente o dano às membranas e a morte celular. Essas informações corroboram os resultados encontrados nesse estudo, visto que os extratos de cálices apresentaram maiores CH₅₀, ou seja, menores capacidades hemolíticas e esses são os que exibiram maiores teores de compostos fenólicos.

Os resultados demonstram que as concentrações dos extratos que apresentaram boas respostas nos testes antileishmania estão abaixo das concentrações hemolíticas dos extratos.

Já com relação ao teste de inibição da acetilcolinesterase, verificou-se que a CI₅₀ de EEHSC foi abaixo, no entanto muito próxima a concentração que causou 50% de hemólise no teste de citotoxicidade. Dessa forma, seria interessante a busca de estratégias para reduzir a CI₅₀ ou a CH₅₀ desse extrato como por exemplo a aplicação do extrato em sistema nanoestruturados.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Foram isolados de forma eficiente compostos diferentes dos diferentes extratos, sendo ainda necessários mais estudos para confirmar a identidade dessas substâncias;
- Determinou-se a concentração de compostos polifenólicos totais e flavonoides, bem como a correlação dos últimos com as atividades antioxidantes determinadas por duas das técnicas empregadas;

- Pela primeira vez foram avaliadas as atividades antileishmania contra formas promastigotas de *L. amazonenses* e de inibição da enzima acetilcolinesterase de extratos de cálices e folhas de *H. sabdariffa*, verificando-se um destaque para os extratos aquoso e etanólico do cálice para cada atividade, respectivamente;
- Nenhum dos extratos exibiu atividade antimicrobiana satisfatória nas concentrações e para as estirpes testadas, sendo necessário a investigação dessa atividade contra outros microrganismos.
- Os extratos obtidos a partir de folhas da espécie apresentaram maior citotoxicidade contra eritrócitos humanos que os provenientes de cálices;
- A CI_{50} de interesse para a utilização de EEHSC em atividade de inibição enzimática está muito próxima da CH_{50} hemolítica, sendo necessária a busca de estratégias que reduzam a IC_{50} ou a citotoxicidade dos extratos;
- A CI_{50} de EAHSC e EAHSF para a atividade antileishmania foram bem abaixo que as CH_{50} hemolíticas, demonstrando que os extratos podem ser utilizados no desenvolvimento de tratamentos alternativos para a leishmaniose cutânea, sendo necessários ainda a realização de testes de citotoxicidade contra outras células normais.

CAPÍTULO 3

SÍNTESE VERDE, CARACTERIZAÇÃO E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE NANOPARTÍCULAS DE PRATA OBTIDAS UTILIZANDO EXTRATOS AQUOSOS DE *Hibiscus sabdariffa* L.

1 INTRODUÇÃO

O desenvolvimento de nanopartículas metálicas, especialmente derivadas de metais nobres, como por exemplo a prata, tem se destacado para aplicações médicas devido a suas propriedades únicas, tais como estabilidade química, boa condutividade, atividade catalítica, além de propriedades antimicrobianas (AHMED et al., 2016).

A maioria dos métodos químicos de síntese de nanopartículas de prata (AgNPs) baseia-se no uso de produtos redutores e estabilizantes tóxicos. No entanto, vêm surgindo alguns métodos viáveis e ambientalmente seguros, chamados de “verdes” que utilizam extratos vegetais para a síntese dessas nanopartículas (HAIDER; KANG, 2015).

Alguns estudos já confirmaram que extratos aquosos da espécie *Hibiscus sabdariffa* podem ser utilizados em química verde para sintetizar AgNPs (KUMAR et al., 2014; CATALDO; URSINI; ANGELINI, 2016; KALITA; GANGULI, 2016). No entanto, o enfoque desses estudos não foi avaliar suas propriedades biológicas.

Dessa maneira, o presente estudo teve como objetivo empregar extratos aquosos de folhas e cálices de *H. sabdariffa* em método verde para sintetizar AgNPs e avaliar as possíveis atividades biológicas e de toxicidade das mesmas.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Síntese das AgNPs

Para a síntese verde de AgNPs, utilizou-se os extratos EAHSC e EAHSF, obtidos segundo metodologia descrita no capítulo 2 (item 2.2). Nove mililitros de solução aquosa de nitrato de prata (AgNO_3) com concentração de 1 mM foram colocados sob agitação magnética constante e então 1 mL de solução de EAHSC e EAHSF à 20 mg/mL e pH ajustado para 11 com hidróxido de sódio (NaOH) foi adicionado a cada um dos sistemas. As misturas permaneceram em agitação à temperatura ambiente por 60 minutos.

2.2 Caracterização das AgNPs

2.2.1 Espectroscopia UV-VIS

O progresso das reações de síntese das AgNPs foram monitorados por medições de espectroscopia UV-VIS utilizando um espectrofotômetro Shimadzu® UV-1800.

2.2.2 Espalhamento de luz dinâmico (*Dynamic Light Scatterin* - DLS) e Mobilidade eletroforética (potencial zeta)

O tamanho médio das nanopartículas e o índice de polidispersão (PDI) foram determinados pela técnica de análise de espalhamento de luz dinâmico (espectroscopia de correlação de fótons – DLS), com laser de comprimento de onda de 633 nm em um ângulo de dispersão fixo de 90° e o potencial zeta foi determinado pela mobilidade eletroforética das amostras utilizando equipamento Malvern Zetasizer Nano®, Modelo ZS 3600. As amostras foram medidas em triplicata e descritas em média ± desvio padrão.

2.2.3 Análise de rastreamento de nanopartículas (*Nanoparticle Tracking Analysis* - NTA)

As medições foram realizadas em equipamento Malvern NanoSight® NS300, utilizando um módulo LASER de 542 nm e o software NTA 3.2. Uma alíquota de 1 ml de amostra diluída em água Milli-Q® foi injetada lentamente na câmara de amostra e, então, foram capturados 5 vídeos de 1 minuto (total de 5 minutos). Em cada vídeo um conjunto distinto de nanopartículas foi analisado, de modo a aumentar a representatividade estatística. Cada um foi analisado independentemente, determinando-se uma distribuição de tamanhos e uma concentração total por vídeo. No final, o software combinou os dados, apresentando a distribuição média (ponderada) de tamanhos e o valor da concentração, com os respectivos valores de erro associados.

2.2.5 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia na região do infravermelho foi realizada em espectrômetro Shimadzu® IRAffinity-1S, na faixa espectral de 4000-700 cm⁻¹ de resolução, pela técnica ATR (*Attenuated Total Reflectance*). Em todas as amostras foram realizadas 45 scans em cristal de seleneto de zinco para a identificação dos grupos funcionais presentes na AgNP-EAHSC.

2.3 Atividades biológicas das AgNPs

2.3.1 Atividade antioxidante

a) Ensaio da atividade sequestrante 2,2-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6- ácido sulfônico) (ABTS)

A capacidade antioxidante foi determinada pela determinação da capacidade de sequestro do radical livre ABTS^{•+} [2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] de acordo com a metodologia proposta por Re et al. (1999) e modificada por Gião et al. (2007). Nesta técnica há produção direta do cromóforo (azul/verde) por meio da reação entre ABTS e persulfato de potássio. A solução de ABTS^{•+}, foi preparada através da adição, a 1:1 (v/v), de 7 mmol/l de solução de sal de ABTS^{•+} (2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico) a 2,45 mmol/l de soluções de persulfato de potássio.

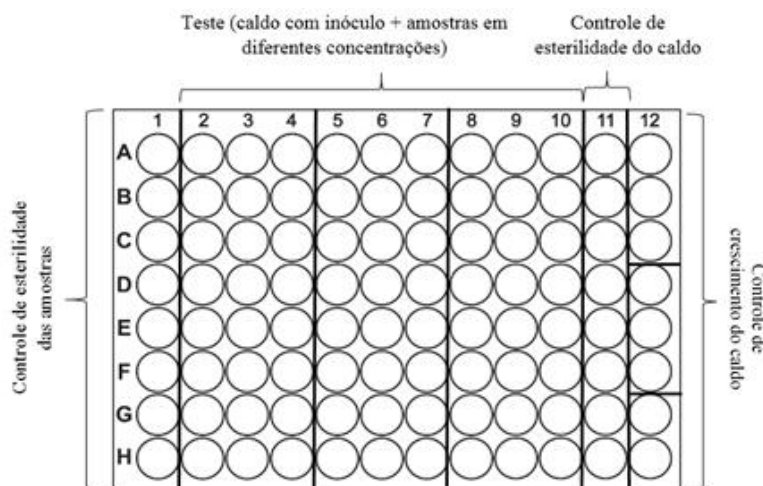
Utilizou-se um volume preciso de cada amostra para obter uma porcentagem de inibição entre 20 e 80%, por 6 min de reação, com 1 mL de solução ABTS^{•+} a partir da fórmula $PI (\%) = (Abs_{ABTS^{•+}} - Abs_{amostra}/Abs_{ABTS^{•+}}) \times 100$, onde PI (%) representa a porcentagem de inibição, $Abs_{ABTS^{•+}}$ corresponde à absorbância inicial do ABTS^{•+} diluído e $Abs_{amostra}$ refere-se à absorbância da amostra após 6 minutos de reação. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro 6405/UV-Vis-Spectrophotometer[®] (Jenway, United Kingdom) a 734 nm em triplicata. Foi utilizada curva de calibração previamente preparada com ácido ascórbico como padrão, o resultado final foi expresso como concentração equivalente de ácido ascórbico (AAE).

2.3.2 Atividade antimicrobiana

Foi realizado o ensaio de microdiluição em caldo de acordo com metodologia descrita em 2013 por Quelemes e colaboradores para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) das AgNPs frente à cinco espécies de bactérias, três Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212) e duas Gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 25922 e *Salmonella typhimurium* ATCC 1401) e à uma espécie de fungo *Candida albicans*. As suspensões bacterianas foram preparadas em caldo Mueller-Hinton a uma concentração de 5×10^5 UFC/mL e, a fúngica, em caldo RPMI 1640 tamponado com MOPS a 10^3 UFC/mL. Por meio de diluições seriadas de

razão dois (1:2) foram obtidas concentrações variando de 3 a 48,6 $\mu\text{g Ag}^+/\text{mL}$, disposta em placas de 96 poços de acordo com a figura 1.

Figura 1. Desenho experimental para determinação da CIM de AgNP-EAHSC e AgNO₃ frente às bactérias *E. coli*, *E. faecalis*, *S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. typhimurium* e ao fungo *C. albicans*.



Fonte: Autoria própria (2018)

2.3.3 Atividade hemolítica

Foi investigada a possível capacidade da AgNP causar lesões diretas à membrana plasmática de eritrócitos baseando-se em método descrito por Marani et al. (2015). Para isso, sangue de um doador voluntário saudável foi coletado em tubo contendo anticoagulante e os eritrócitos foram lavados 3 vezes em solução salina (NaCl 0,85%) por centrifugação (3000 rpm/15 min) para redução da contaminação plasmática e ressuspensos em salina para obtenção de uma suspensão de eritrócitos a 2,5%.

Os ensaios foram realizados em placas de 96 poços. Cada poço, a partir da fileira B recebeu 150 μL da solução salina. Na fileira A, os poços receberam 300 μL de solução de AgNP em triplicata, em seguida foi retirado 150 μL de cada poço da fileira A e realizando diluições seriadas para cada fileira vertical de modo que as concentrações variaram de 0,38 a 48,6 $\mu\text{g Ag}^+/\text{mL}$. O mesmo procedimento foi realizado com a AgNO₃ pura nas mesmas concentrações. Em seguida, foram plaqueados em todos os poços 150 μL de suspensão de eritrócitos. Para o controle positivo utilizou-se a mesma proporção de salina/Triton X (concentração). Após incubação de 30 minutos em estufa à temperatura de 36 °C, as amostras foram centrifugadas (8000 rpm por 1 min) e o sobrenadante transferido para uma outra placa para a leitura da absorbância no leitor de microplacas a 492 nm.

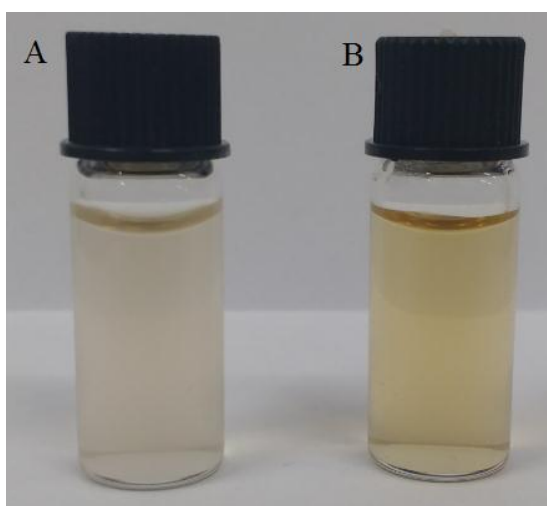
Os resultados de porcentagem de hemólise foram obtidos por meio da fórmula: Hemólise (%) = $\frac{Abs_{amostra} - Abs_{negativo}}{Abs_{positivo} - Abs_{negativo}}$, onde $Abs_{negativo}$ representa a absorbância da salina e $Abs_{positivo}$ indica a absorbância do Triton. Os resultados foram expressos em concentração efetiva capaz de hemolisar 50% das hemácias (CH_{50}) que foi calculada utilizando-se equações da reta ($y = ax+b$) obtidas por meio de regressão linear com coeficientes de correlação próximos a 1 ($R^2 = 0,97 - 0,99$), de acordo com a metodologia descrito por Brien-Simpson et al. (2016).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização das AgNPs

Verificou-se que em AgNP-EAHSC houve uma mudança progressiva na coloração (figura 2), indicativa da formação de AgNPs.

Figura 2. Mudança na coloração da solução de nanopartículas de prata sintetizadas por rota verde com extrato aquoso de cálices de *Hibiscus sabdariffa* (AgNP-EAHSC) - (A) dia da síntese; (B) 4 semanas após a síntese.



Fonte: Autoria própria (2018)

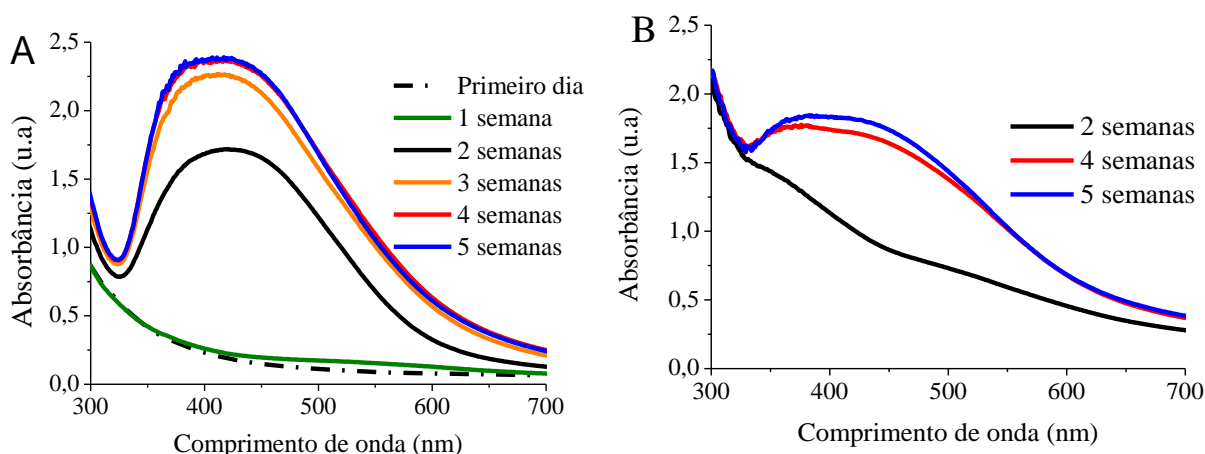
3.1.1 Espectroscopia UV-VIS

A partir dos resultados de espectroscopia, foi possível verificar que após duas semanas surgiu uma banda plasmônica na região de 420 nm em AgNP-EAHSC, como mostrado na figura 3 (A). Essa banda indica a redução de $AgNO_3$ e formação de AgNPs. A reação continuou ocorrendo em AgNP-EAHSC até a quarta semana, estabilizando após esse período.

No tocante à AgNP-EAHSF, observou-se que somente após 4 semanas da síntese, houve o indicativo da formação de uma banda na região de 400 a 450 nm que não ficou tão evidente mesmo após 5 semanas da síntese, como demonstrado na figura 3 (B).

Dessa forma, optou-se pelo prosseguimento das outras etapas de caracterização e avaliação de atividades biológicas apenas com a AgNP-EAHSF, visto o menor tempo de síntese e estabilização das mesmas quando comparadas à AgNP-EAHSF e, a maior possibilidade de esta apresentar tamanhos de partículas maiores, visto que quanto maior a largura da banda, maiores serão os tamanhos e a dispersão das partículas (MLALILA et al., 2017).

Figura 3. Espectros de UV-VIS para as AgNPs. (A) AgNP-EAHSF; (B) AgNP-EAHSF.



Fonte: Autoria própria (2018)

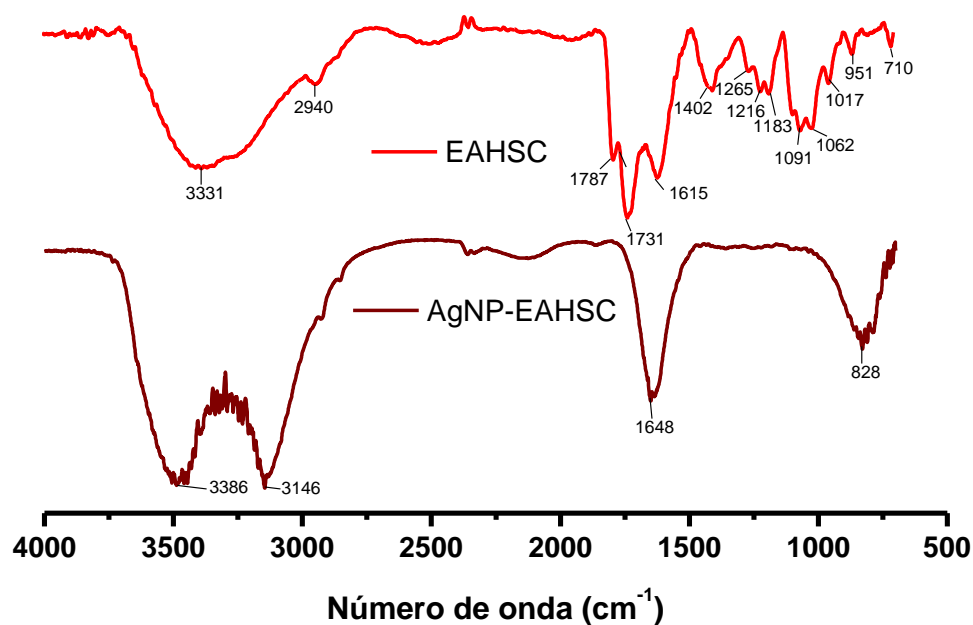
Os resultados encontrados na literatura corroboram com os espectros de UV-VIS desse estudo, pois extratos aquosos de *H. sabdariffa*, já foram empregados em síntese verde de AgNPs, tanto os de cálices (KUMAR et al., 2014) quanto os foliares (KALITA; GANGULI, 2016). Tais estudos verificaram que AgNPs obtidas com extratos de folhas da espécie apresentaram maior dispersão entre as partículas com diâmetros variando de 5-60 nm, enquanto as sintetizadas com extratos do cálice apresentaram-se mais homogêneas com tamanhos em torno de 20 nm.

3.1.2 Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

O FT-IR foi realizado para identificar as ligações e grupos funcionais associados à síntese da AgNP. Os resultados de FTIR obtidos para a AgNP-EAHSF estão expressos na figura 4.

Os espectros de EAHSC e AgNPs-EAHSC demonstram algumas diferenças. As bandas 3331 cm^{-1} e 2940 cm^{-1} do extrato relacionadas a ligações O-H resultantes de associações poliméricas e ligações de hidrogênio intramolecular com C=O, estão deslocadas na nanopartícula para 3386 cm^{-1} e para 3186 cm^{-1} , com aumento de intensidade na segunda. Além disso, todas as bandas presentes na região de $700\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ que incluem bandas de estiramento relacionadas a ligações C-H de anel aromático, ligações C=O, atribuída a grupos carbonila e grupos éter, foram consumidas, sendo que houve o surgimento de uma banda em 1648 cm^{-1} em AgNP-EAHSC que corresponde a ligações C=O de amidas associadas (AMIR, 2013).

Figura 4. Espectros de absorção na região do infravermelho para EAHSC e AgNP-EAHSC EAHSC - extrato aquoso de cálices; AgNP-EAHSC – nanopartículas de prata obtidas com extrato aquoso de cálices de *Hibiscus sabdariffa*.



Fonte: Autoria própria (2018)

Dessa forma, confirma-se que compostos fitoquímicos presentes no extrato estiveram envolvidos na redução dos íons Ag^+ em Ag^0 e conseqüentemente no processo de síntese verde das AgNPs.

3.1.3 Tamanho médio, índice de polidispersão e potencial zeta de AgNP-EAHSC

O tamanho médio, o índice de polidispersão e o potencial zeta das AgNP-EAHSC estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1. Tamanho médio, PDI e potencial zeta da AgNP-EAHSC.

Tamanho médio (nm)	Índice de Polidispersão (PDI)	Potencial zeta (mV)
56,27 ± 4,6	0,693 ± 0,14	-20,58 ± 0,3

Fonte: Autoria própria (2018)

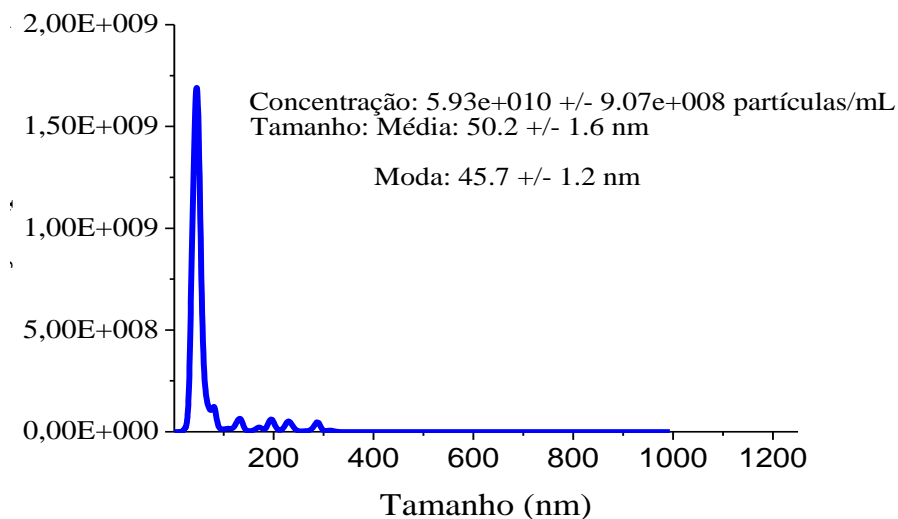
O valor médio observado para o diâmetro hidrodinâmico indicado pelo equipamento foi de $56,7 \pm 4,6$ nm, estando, portanto, em escala nanométrica.

O grau de polidispersão (PDI), que indica estabilidade coloidal em solução de AgNPs, foi $0,693 \pm 0,14$. As nanopartículas de prata formadas por rotas de síntese verde geralmente possuem um PDI moderado, os quais variam de 0,3 a 0,5.

O valor de potencial zeta indica estabilidade do sistema, para os quais valores acima de 30 em módulo demonstram boa estabilidade por repulsão iônica. O valor encontrado para as AgNPs sintetizadas foi de $-20,58 \pm 0,3$ mV, confirmando que o princípio de estabilização de AgNP-EAHSC não é por repulsão iônica e que se deve, possivelmente a ligações intermoleculares dos compostos bioativos do extrato, como demonstrado nos resultados de FTIR.

A análise de rastreamento mostrou que o processo de síntese utilizado resultou em uma suspensão contendo $5,93 \times 10^{10}$ nanopartículas/ml como pode ser observado na figura 5. O tamanho médio das AgNP-EAHSC foi de $50,2 \pm 1,6$ nm, semelhante ao encontrado por análise de DLS, mas levemente menor. O diâmetro hidrodinâmico refere-se ao tamanho da partícula propriamente dita acrescida do tamanho das moléculas advinda do material vegetal que ficam ao redor da partícula estabilizando-a, o que explica o tamanho médio maior nas análises por essa técnica.

Figura 5. Distribuição do tamanho e concentração de AgNP-EAHSC por análise de rastreamento de nanopartículas.



Fonte: Autoria própria (2017)

3.2 Atividades biológicas de AgNP-EAHSC

3.2.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante das nanopartículas foi realizada empregando o método de sequestro do radical ABTS. Foi obtido resultado de $5,8 \pm 6,1$ μg AAE/mL de AgNP, portanto menor que o encontrado para EAHSC apresentado no item 3.6.1 do capítulo 2 ($46,9 \pm 1,8$ mg AAE/g de extrato), o que era esperado, visto que as moléculas com essa capacidade foram consumidas durante o processo de síntese da AgNP.

O resultado desse ensaio demonstrou que possivelmente a AgNP-EAHSC tem outros mecanismos diferentes de ação antioxidante e direciona para a escolha de testes que se baseiem em outras técnicas para uma melhor avaliação de sua capacidade.

3.2.2 Concentração inibitória mínima (CIM)

Os resultados obtidos para o teste antimicrobiano das amostras estão representados na tabela 2.

A atividade foi dose-dependente tanto para as nanopartículas quanto para o controle nitrato de prata. Não foram expressas as três menores concentrações testadas na tabela visto que houve crescimento em todos esses poços.

A AgNP-EAHSC foi capaz de inibir todos os microrganismos na mais alta concentração testada (48,6 $\mu\text{g Ag}^+/\text{mL}$) e na segunda mais alta (24,3 $\mu\text{g Ag}^+/\text{mL}$) inibiu *E. coli*, *E. faecalis*, *S. epidermidis* e *S. typhimurium*. O AgNO_3 exibiu uma atividade levemente superior à AgNP-EAHSC, no entanto é importante verificar a biocompatibilidade e o perfil toxicológico do sal e dos nanomateriais, visto que a maioria deles parece não serem biodegradáveis e permanecerem na natureza e nos tecidos durante anos (SOARES, 2014).

Tabela 2. Concentrações inibitórias mínimas (CIM) de AgNP-EAHSC e do controle de solução de nitrato de prata (AgNO_3).

Espécies	MIC ($\mu\text{g Ag}^+/\text{mL}$)	
	AgNP-EAHSC	AgNO_3
<i>C. albicans</i>	48,6	6,1
<i>E. coli</i>	24,3	24,3
<i>E. faecalis</i>	24,3	12,5
<i>S. aureus</i>	48,6	24,3
<i>S. epidermidis</i>	24,3	12,5
<i>S. typhimurium</i>	24,3	24,3

Fonte: Autoria própria (2018)

3.2.3 Atividade hemolítica

Os resultados obtidos para o teste de hemólise estão expressos na tabela 3.

Tabela 3. Concentrações efetivas de AgNP-EAHSC e AgNO_3 para causar 50% de hemólise.

Amostra	CH_{50} ($\mu\text{gAg}^+/\text{mL}$)
AgNP-EAHSC	50,93 \pm 3,15
AgNO_3	29,59 \pm 2,69

Fonte: Autoria própria (2018)

Verificou-se que, embora AgNP-EAHSC tenha apresentado menor atividade antimicrobiana que AgNO_3 para algumas das cepas testadas (*C. albicans*, *E. faecalis* e *S. epidermidis*), a mesma exibiu menor toxicidade contra eritrócitos e que a CH_{50} observada foi maior que as concentrações de interesse demonstradas nos testes.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Utilizou-se extratos aquosos de cálices e folhas de *H. sabdariffa* para a síntese verde de nanopartículas de prata;
- Verificou-se que os extratos de cálices foram mais eficientes que os de folhas na redução dos íons Ag^+ e consequente formação das AgNPs.
- Caracterizou-se AgNPs-EAHSC obtida com extratos de cálice por meio das técnicas de FTIR, PDI, NTA, DLS e Potencial zeta.
- Confirmou-se que os compostos fitoquímicos presentes no extrato estiveram envolvidos no processo de síntese, o tamanho nanométrico das partículas, a estabilidade coloidal compatível com o tipo de nanopartícula e que o princípio de estabilização das mesmas não se dá por repulsão iônica.
- Verificou-se capacidade antioxidante da AgNP-EAHSC e que a mesma exibiu atividade contra todas as cepas microbianas testadas, sendo mais efetiva contra *E. coli*, *E. faecalis*, *S. epidermidis* e *S. typhimurium*.
- Verificou-se que AgNP-EAHSC apresentou-se menos citotóxicas que AgNO_3 .

PERSPECTIVAS

- Isolar e identificar por meio de espectrometria de massas os picos majoritários de cada extrato de *H. sabdariffa* obtidos nas análises por CLAE;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos extratos de *H. sabdariffa* por meio da técnica de diluição em caldo;
- Caracterizar morfológicamente a AgNP-EAHSC por meio da técnica de microscopia de força atômica;
- Avaliar a capacidade antioxidante de AgNP-EAHSC por meio das técnicas de DPPH e FRAP;
- Determinar as atividades antileishmania e de inibição enzimática *in vitro* de AgNP-EAHSC;

REFERÊNCIAS

- ABBASI, E.; MILANI, M.; AVAL, S. F.; KOUHI, M.; AKBARZADEH A.; NASRABADI, H. T.; NIKASA, P.; JOO, S. W.; HANIFEHPOUR Y.; NEJATI-KOSHKI K.; SAMIEI, M. Silver nanoparticles: synthesis methods bio-applications and properties. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 42, n. 2, p. 173-180, 2016.
- ABU-MEJDAD, N. M. J. A.; AL-HILFY, A. A. A. Evaluation of therapeutic effects of vicine against *leishmania donovani* *in vitro*. **Journal of American Science**, v. 9, n. 5, p. 115–120, 2013.
- AGNIHOTRI, S.; MUKHERJI, S.; MUKHERJI, S. Size-controlled silver nanoparticles synthesized over the range 5-100 nm using the same protocol and their antibacterial efficacy. **RSC Advances**, v. 4, n. 8, p. 3974–3983, 2014.
- AHMED, F.; GHALIB, R. M.; SASIKALA, P.; AHMED, K. K. M. Cholinesterase inhibitors from botanicals. **Pharmacognosy Reviews**, v. 7, n. 14, p. 121–130, 2013.
- AHMED, S.; MUDASIR, A.; SWAMI, B. L.; IKRAM; S. A review on plants extract mediated synthesis of silver nanoparticles for antimicrobial applications: a green expertise. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 1, p. 17–28, 2016.
- AL-RIMAWI, F.; ODEH, I.; BISHER, A.; ABBAD, J.; QABBAJEH, M. Effect of geographical region and harvesting date on antioxidant activity, phenolic and flavonoid content of *Olive* reaves. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 2, n. 12, p. 925–930, 2014.
- ALARCÓN-ALONSO, J.; ZAMILPA, A.; AGUILAR F. A.; HERRERA-RUIZ, M.; TORTORIELLO, J.; JIMENEZ-FERRER, E. Pharmacological characterization of the diuretic effect of *Hibiscus sabdariffa* Linn (Malvaceae) extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, p. 751–756, 2012.
- ALI, M. K.; ASHRAF, A.; BISWAS, N. N.; KARMAKAR, U. K.; AFROZ, S. Antinociceptive, anti-inflammatory and antidiarrheal activities of ethanolic calyx extract of *Hibiscus sabdariffa* Linn. (Malvaceae) in mice. **Journal of Chinese Integrative Medicine**, v. 9, n. 6, p. 626–631, 2011.
- ALSHAMI, I.; ALHARBI, A. E. Antibacterial effect of *Hibiscus sabdariffa* (Roselle) extract in synergism with voriconazole and fluconazole against fluconazole-resistant *Candida albicans* isolates: an *in vitro* study. **Biomedical Research**, v. 25, n. 3, p. 401–404, 2014.
- ALSHEHRI, A.; MALIK, A. Advances biofabrication of Fe nanoparticles in aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* with enhanced photocatalytic activities. **RSC Advances**, v. 7, p. 25149–25159, 2017.
- AMIR, R. M.; ANJUM, F. M.; KHAN, M. I.; KHAN, M. R.; PASHA, I.; NADEEM, M. Application of fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy for the identification of wheat varieties. **Journal of Food Science and Technology**, v. 50, n. 5, p. 1018 - 1023, 2013.
- ANBUKKARASI, M.; THOMAS, P. A.; SHEU, J.; GERALDINE, P. *In vitro* antioxidant and anticataractogenic potential of silver nanoparticles biosynthesized using an ethanolic extract of *Tabernaemontana divaricata* leaves. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 91, p. 467-475, 2017.

- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão phenolic compounds in foods – A brief review. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.
- ANOKWURU, C. P.; ESIABA, I; AJIBAYE, O; ADESUYI, A O. Polyphenolic content and antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* calyx. **Research Journal of Medicinal Plant**, v. 5, n. 5, p. 557–566, 2011.
- ANTONIO, J. R.; BALLAVENUTO, J. M. A.; ANTÔNIO, C. R.; OLIVEIRA, J. R.; CARDEAL, I. L. S. Nanotechnology in dermatology. **Anais brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 1, p. 126–136, 2014.
- ARÉVALO-LOPÉZ, D.; NINA, N.; TICONA, J. C.; LIMACHI, I.; SALAMANCA, E.; UDAETA, E.; PAREDES, C.; ESPINOZA, B.; SERATO, A.; GARNICA, D.; LIMACHI, A.; COAQUIRA, D.; SALAZAR, S.; FLORES, N.; STERNER, O.; GIMÉNEZ, A. Leishmanicidal and cytotoxic activity from plants used in Tacana traditional medicine (Bolivia). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 216, p. 120–133, 2018.
- ARYA, G.; KUMARI, R. M.; GUPTA, N.; KUMAR, A.; NIMESH, S. Green synthesis of silver nanoparticles using *Prosopis juliflora* bark extract: reaction optimization, antimicrobial and catalytic activities. **Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology**, p. 1–9, 2017.
- AZIZ, M.; KARBOUNE, S. Natural antimicrobial antioxidant agents in meat and poultry products as well as fruits and vegetables: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1–83, 2016.
- BAGHAYERI, M.; MAHDAVI, B.; ABADI, Z. H.; FARHADI, S. Green synthesis of silver nanoparticles using water extract of *Salvia leriifolia*: antibacterial studies and applications as catalysts in the electrochemical detection of nitrite. **Applied Organometallic Chemistry**, v. 32, p. 1–9, 2018.
- BILAL, M.; RASHEED, T.; IQBAL, M. N. H.; HU, H.; WANG, W.; ZHANG, X. Macromolecular agents with antimicrobial potentialities: A drive to combat antimicrobial resistance. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 554–574, 2017.
- BILIA, A. R.; PIAZZINI, V.; GUCCIONE, C.; RISALITI, L.; ASPREA, M.; CAPECCHI, G.; BERGONZI, M. C. Improving on nature: the role of nanomedicine in the development of clinical natural drugs. **Journal of Medicinal Plant and Natural Product Research**, v. 83, p. 366–381, 2017.
- BONIFÁCIO, B. V.; SILVA, P. B.; RAMOS, M. A. S.; NEGRI, K. M. S.; BAUAB, T. M.; CHORILLI, M. Nanotechnology-based drug delivery systems and herbal medicines: a review. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, p. 1–15, 2014.
- BORRÁS-LINARES, I.; FERNÁNDEZ-ARROYO, S.; ARRÁEZ-ROMAN, D.; PALMEROS-SUÁREZ, P. A.; VAL-DÍAZ, R.; ANDRADE-GONZÁLES, I.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; GÓMEZ-LEYVA, J. F.; SEGURA-CARRETERO, A. Characterization of phenolic compounds, anthocyanidin, antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (*Hibiscus sabdariffa*). **Industrial Crops & Products**, v. 69, p. 385–394, 2015.

- BRIEN-SIMPSON, N. M. O.; PANTARAT, N.; ATTARD, T. J.; WALSH, K. A.; REYNOLDS, E. C. A rapid and quantitative flow cytometry method for the analysis of membrane disruptive antimicrobial activity. **Plos One**, p. 1–15, 2016.
- CÂNDIDO, H. T.; STURZA, J. A. I.; BARBOSA, R. C. Colhendo conhecimentos: estudo etnobotânico sobre a vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.) na Universidade Federal de Mato Grosso – Campus Universitário de Rondonópolis, **Cadernos de Agroecologia**, v. 11, n. 2 2017.
- CARNEIRO, S. M.; CARVALHO, F. A.; SANTANA, L. C.; SOUSA, A. P.; NETO, J. M.; CHAVES, M. H. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). **Biological Research**, v. 45, n. 2, p. 111 - 116, 2012.
- CATALDO, F.; URSINI, O.; ANGELINI, G. Synthesis of silver nanoparticles by radiolysis, photolysis and chemical reduction of AgNO₃ in *Hibiscus sabdariffa* infusion. **Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry**, v. 307, n.1, p. 447–455, 2016.
- CHIU, C.; CHEN, J.; CHOU, F.; LIN, H. *Hibiscus sabdariffa* Leaf extract inhibits human prostate cancer cell invasion via down-regulation of Akt/NF-(B/MMP-9 pathway. **Nutrients**, v. 7, p. 5065–5087, 2015.
- DA-COSTA-ROCHA, I.; BONNLAENDER, B.; SIEVERS, H.; PISCHEL, I.; HEINRICH, M. *Hibiscus sabdariffa* L. – A phytochemical and pharmacological review. **Food Chemistry**, v. 165, p. 424–443, 2014.
- DALAI, M. K.; BHADRA, S.; CHAUDHARY, S. K.; BANDYOPADHYAY, A.; MUKHERJEE, P. K. Anti-cholinesterase potential of *Cinnamomum tamala* (Buch .-Ham.). **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 13, n. 4, p. 691–697, 2014.
- DJAHANIANI, H. Facile synthesis of silver nanoparticles using *Tribulus longipetalus* extract and their antioxidant and antibacterial activities. **International Journal of Food Properties**, v. 20, n. 4, p. 922–930, 2017.
- DO, Q. D.; ANGKAWIJAYA, A. E.; TRAN-NGUYEN, P. L.; HUYNH, L. H. H.; SOETAREDJO, F. E.; ISMADJI, S. I.; JU, Y. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, p. 296–302, 2014.
- DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**, p. 1-16, 2006.
- DWIVEDI, A. D.; GOPAL, K. Biosynthesis of silver and gold nanoparticles using *Chenopodium album* leaf extract. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 369, n. 1–3, p. 27–33, 2010.
- EDDY, N. O.; ITA, B. I.; DODO, S. N.; PAUL, E. D. Inhibitive and adsorption properties of ethanol extract of *Hibiscus sabdariffa* calyx for the corrosion of mild steel in 0.1 M HCl. **Green Chemistry Letters and Reviews**, v. 5, n. 1, p. 43–53, 2012.
- 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.
- EZZAT, S. M.; SALAMA, M. M.; EL-DIN, S. H. S.; SALEH, S.; EL-LAKKANY, N. M.;

- HAMMAM, O. A.; SALEM, M. B.; BOTROS, S. S. Metabolic profile and hepatoprotective activity of the anthocyanin-rich extract of *Hibiscus sabdariffa* calyces. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 12, p. 3172–3181, 2016.
- FAMUREWA, A. C.; KANU, S. C.; OGUGUA, V. N. Protective effect of pretreatment of rats with calyx extract of *Hibiscus sabdariffa* against carbon tetrachloride-induced hematotoxicity. **Journal of Biological Sciences**, v. 15, n. 3, p. 138–143, 2015.
- FATIMAH, I. Green synthesis of silver nanoparticles using extract of *Parkia speciosa* Hassk pods assisted by microwave irradiation. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 6, p. 961–969, 2016.
- FERREIRA, H. S.; RANGEL, M. C. Nanotecnologia: aspectos gerais e potencial de aplicação em catálise. **Química Nova**, v. 32, n. 7, p. 1860–1870, 2009.
- FIGUEIRA, I.; GARCIA, G.; PIMPÃO, R. C.; TERRASSO, A. P.; COSTA, I.; ALMEIDA, A. F.; TAVARES, L.; PAIS, T. F.; VENTURA, M. R.; FILIPE, A.; MCDOUGALL, G. J.; STEWART, D.; KIM, K. S.; PALMELA, I.; BRITO, M. A.; BRITO, C.; SANTOS, C. N. Polyphenols journey through blood-brain barrier towards neuronal protection. **Scientific Reports**, v. 7, n. 11456, p. 1–16, 2017.
- FIRMO, W. C. A.; MENEZES, V. J. M.; PASSOS, C. E. C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; SANTOS NETO, M.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, p. 90–95, 2011.
- FORMAGIO, A. S. N.; RAMOS, D. D.; VIEIRA, M. C.; RAMALHO, S. R.; SILVA, M. M.; ZÁRATE, N. A. H.; FOGGIO, M. A.; CARVALHO, J. E. Phenolic compounds of *Hibiscus sabdariffa* and influence of organic residues on its antioxidant and antitumoral properties. **Brazilian Journal of Biology**, v. 75, n. 1, p. 69–76, 2015.
- FREITAS, N. M.; SANTOS, A. M. C. M.; MOREIRA, L. R. DE M. O. Avaliação fitoquímica e determinação de minerais em amostras de *Hibiscus sabdariffa* L (vinagreira). **Cadernos de Pesquisa**, v. 20, n. 3, p. 65–72, 2013.
- GHOLAMI-SHABANI, M.; AKBARZADEH, A.; NOROUZIAN, D.; AMINI, A.; GHOLAMI-SHABANI, Z.; IMANI, A.; CHIANI, M.; RIAZI, G.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Antimicrobial activity and physical characterization of silver nanoparticles green synthesized using nitrate reductase from *Fusarium oxysporum*. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 172, n. 8, p. 4084–4098, 2014.
- GIÃO, M. S.; GONZÁLEZ-SANJOSÉ, M. L.; RIVERO-PÉREZ, M. D.; PEREIRA, C. I.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Infusions of portuguese medicinal plants: dependence of final antioxidant capacity and phenol content on extraction features. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 14, p. 2638–2647, 2007.
- GIRONÉS-VILAPLANA, A.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B.; FERRERES, F.; MORENO D. A.; GARCÍA-VIGUERA, C. Phytochemical profile of a blend of black chokeberry and lemon juice with cholinesterase inhibitory effect and antioxidant potential. **Food Chemistry Journal**, v. 134, p. 2090–2096, 2012.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374–381, 2007.
- GOODMAN, A. M.; CAO, Y.; URBAN, C.; NEUMANN, O.; AYALA-OROZCO, C.;

- KNIGHT, M. W.; JOSHI, A.; NORDLANDER, P.; HALAS, N. J. The surprising *in vivo* instability of near-IR-absorbing hollow Au-Ag nanoshells. **ACS Nano**, v. 8, n. 4, p. 3222–3231, 2014.
- HAIDER, A.; KANG, I. Preparation of silver nanoparticles and their industrial and biomedical applications: a comprehensive review. **Advances in Materials Science and Engineering**, v. 2015, p. 1-16, 2015.
- HAMARSHEH, O.; AZMI, K.; AMRO, A.; ABDEEN, Z.; FIRDESSA, R.; SAWALHA, K. Antileishmanial potential of crude plant extracts derived from medicinal plants in Palestine. **Annals of Clinical Cytology and Pathology**, v. 3, n. 4, p. 1–7, 2017.
- HASAN, S. A review on nanoparticles: their synthesis and types. **Research Journal of Recent Sciences**, v. 4, p. 9–11, 2015.
- HASSAN, S. T. S.; BERCHOVÁ, K.; SUDOMOVÁ, M. Antimicrobial, antiparasitic and anticancer properties of *Hibiscus sabdariffa* (L.) and its phytochemicals: *in vitro* and *in vivo* studies. **Ceska a Slovenska Farmacie**, v. 65, p. 10–14, 2016.
- HOSSEINI, A.; BAKHTIARI, E.; MOUSAVI, S. H. Protective effect of *Hibiscus sabdariffa* on doxorubicin-induced cytotoxicity in H9c2 cardiomyoblast cells. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 16, n. 2, p. 708–713, 2017.
- IRAVANI, S.; KORBOKANDI, H.; MIRMOHAMMADI, S. V.; ZOLFAGHARI, B. Synthesis of silver nanoparticles: chemical, physical and biological methods. **Research in Pharmaceutical Sciences**, v. 9, n. 6, p. 385 - 406, 2014.
- ISMAIL, A.; IKRAM, E. H. K.; NAZRI, H. S. M. Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seeds – nutritional composition, protein quality and health benefits. **Food**, v. 2, n. 1, p. 1–16, 2008.
- JAHANGIRIAN, H. LEMRASKI, E.G.; WEBSTER, T. J.; RAFIEE-MOGHADDAM, R.; YADOLLAH, A. A review of drug delivery systems based on nanotechnology and green chemistry: green nanomedicine. **International Journal of Nanomedicine**, v. 12, p. 2957–2978, 2017.
- JAMSHIDI-KIA, F.; LORIGOOINI, Z.; AMINI-KHOEI, H. Medicinal plants: past history and future perspective. **Journal of Hebmed Pharmacology**, v. 7, n. 1, p. 1–7, 2018.
- JIMÉNEZ-FERRER, E.; ALARCÓN-ALONSO, J.; AGUILAR-ROJAS, A.; ZAMILPA, A.; JIMÉNEZ-FERRER, C. I.; TORTORIELLO, J.; HERRERA-RUIZ, M. Diuretic effect of compounds from *Hibiscus sabdariffa* by modulation of the aldosterone activity. **Planta Médica**, v. 78, n. 18, p. 1893-1898, 2012.
- KALITA, N. K.; GANGULI, J. N. *Hibiscus sabdariffa* L. leaf extract mediated green synthesis of silver nanoparticles and its use in catalytic reduction of 4-nitrophenol. **Synthesis and Reactivity in Inorganic, Metal-Organic, and Nano-Metal Chemistry**, v. 47, n. 5, p. 788–793, 2016.
- KAPEPULA, P. M.; KABAMBA, N. N.; TSHISEKEDI, T. P.; TSUMBU C.; FRANCK, T.; MOUTHYS-MICKALAD, A.; MUMBA, D.; TSHALA-KATUMBAY, D.; SERTEYN, D.; TITS, M.; ANGENOT, L.; KALENDA, P. D. T.; FRÉDÉRICH, M. Comparison of metabolic profiles and bioactivities of the leaves of three edible congolese *Hibiscus* species. **Natural Product Research**, v. 31, n. 24, p. 2885–2892, 2017.
- KASOTE, D. M.; KATYARE, S. S.; HEGDE, M. V.; BAE, H. Significance of antioxidant

potential of plants and its relevance to therapeutic applications. **International Journal of Biological Sciences**, v. 11, n. 8, p. 982–991, 2015.

KAUR, R.; KAUR, S. Evaluation of *in vitro* and *in vivo* antileishmanial potential of bergenin rich *Bergenina ligulata* (Wall.) Engl. root extract against visceral leishmaniasis in inbred BALB/c mice through immunomodulation. **Journal of Traditional and Complementary Medicine**, v. 8, p. 251–260, 2018.

KAVITHA, M.; THIRUMURUGAN, V. Green biosynthesis of silver nanoparticles using flower of *Musa paradisiaca* L. with reference to antimicrobial and antioxidant potential. **World Journal of Science and Research**, v. 2, n. 1, p. 18–27, 2017.

KIM, J. S.; KUK, E.; YU, K. N.; KIM, J.; PARK, J. P.; LEE, H. J.; KIM, H.; PARK, Y. K.; PARK, Y. H.; HWANG, C.; KIM, Y.; LEE, Y.; JEONG, D. J.; CHO, M. Antimicrobial effects of silver nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 3, p. 95–101, 2007.

KUMAR, D.; KUMAR, G.; AGRAWAL, V. Green synthesis of silver nanoparticles using *Holarrhena antidysenterica* (L.) Wall. bark extract and their larvicidal activity against dengue and filariasis vectors. **Parasitology Research**, v. 117, n. 2, p. 377–389, 2018.

KUMAR, S. S.; MANOJ, P.; GIRIDHAR, P. Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR) analysis, chlorophyll content and antioxidant properties of native and defatted foliage of green leafy vegetables. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 12, p. 8131–8139, 2015.

KUMAR, V. V.; ANBARASAN S.; CHRISTENA L. R.; SAISUBRAMANIAN N.; ANTHONY S. P. Bio-functionalized silver nanoparticles for selective colorimetric sensing of toxic metal ions and antimicrobial studies. **Spectrochimica Acta - Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 129, p. 35–42, 2014.

KUMAR, V.; SHARMA, N.; SOURIRAJAN, A.; KUMAR, P. DEV, K. Comparative evaluation of antimicrobial and antioxidant potential of ethanolic extract and its fractions of bark and leaves of *Terminalia arjuna* from north-western Himalayas, India. **Journal of Traditional Chinese Medical Sciences**, v. 8, p. 100–106, 2018.

KYUNG, K. H. Antimicrobial properties of allium species. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 142–147, 2012.

LOGESWARI, P.; SILAMBARASAN, S.; ABRAHAM, J. Synthesis of silver nanoparticles using plants extract and analysis of their antimicrobial property. **Journal of Saudi Chemical Society**, v. 19, n. 3, p. 311–317, 2015.

MACIEL, L. G.; DO CARMO, M. A. V.; AZEVEDO, L.; DAGUER, H.; MOLOGNONI, L.; DE ALMEIDA, M. M.; GRANATO, D.; ROSSO, N. D. *Hibiscus sabdariffa* anthocyanins-rich extract: chemical stability, *in vitro* antioxidant and antiproliferative activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 113, p. 187–197, 2018.

MACIEL, M. J.; PAIM, M. P.; CARVALHO, H. H. C.; WIEST, J. M. Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 71, n. 3, p. 462–470, 2012.

MAGALHÃES, L. M.; SEGUNDO, M. A.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C. Methodological aspects about *in vitro* evaluation of antioxidant properties. **Analytica Chimica Acta**, v. 613, p. 1–19, 2008.

- MAHENDIRAN, D.; SUBASH, G.; SELVAN, D. A.; REHANA, D.; KUMAR, R. S.; RAHIMAN, A. K. Biosynthesis of zinc oxide nanoparticles using plant extracts of *Aloe vera* and *Hibiscus sabdariffa*: phytochemical, antibacterial, antioxidant and anti-proliferative studies. **BioNanoScience**, v. 7, n. 3, p. 530–545, 2017.
- MALAR, D. S.; SHAFREEN, R. B.; KARUTHA, S.; DEVI, K. P. Cholinesterase inhibitory, anti-amyloidogenic and neuroprotective effect of the medicinal plant *Grewia tiliaefolia* – An *in vitro* and *in silico* study. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 381–393, 2017.
- MANSOUR, R.; HAOUAS, N.; KAHLA-NAKBI, A. B.; HAMMAMI, S. The Effect of *Vitis vinifera* L. leaves extract on *Leishmania infantum*. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 12, n. 3, p. 349–355, 2013.
- MARANI, M. M.; DOURADO, F. S.; QUELEMES, P. V.; DE ARAUJO, A. R.; PERFEITO, M. L. G.; BARBOSA, E. A.; VÉRAS, L. M. C.; COELHO, A. L. R.; ANDRADE, E. B.; EATON, P.; LONG, J. P. F.; AZEVEDO, R. B.; DELERUE-MATOS, C.; LEITE, J. R. S. A. Characterization and biological activities of ocellatin peptides from the skin secretion of the frog *Leptodactylus pustulatus*. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 7, p. 1495–1504, 2015.
- MARGANHA, E. G.; HALMENSCHLAGER, R. C.; ROSA, R. M.; HENRIQUES, J. A. P.; RAMOS, A. L. L. P.; SAFFI, J. Pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus *Hibiscus*. **Food Chemistry**, v. 118, p. 1–10, 2010.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 3 ed. Fortaleza, UFC, 2009.
- MELECCHI, M. I. S. **Caracterização química de extratos de *Hibiscus tilaceus* L.: estudo comparativo de métodos de extração**. 2005. 197f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.
- MELO JR, J. R.; SANTOS, L. S. S.; GONÇALVES, M. C.; NOGUEIRA, A. F. Preparação de nanopartículas de prata e ouro: um método simples para introdução da nanociência em laboratório de ensino. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872–1878, 2012.
- MEYER, S. L. F.; CHAUHAN, K. R.; MACDONALD, M. H. Evaluation of roselle (*Hibiscus sabdariffa*) leaf and pomegranate (*Punica granatum*) fruit rind for activity against meloidogyne incognita. **Nematropica**, v. 46, n. 1, p. 85–96, 2016.
- MIRANDA, J. A. L.; ROCHA, J. A.; ARAÚJO, K. M.; QUELEMES, P. V.; MAYO, S. J.; ANDRADE, I. M. Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1142–1149, 2015.
- MISHRA, P.; RAY, S.; SINHA, S.; DAS, B.; KHAN, M. I.; BEHERA, S. K.; YUN, S.; TRIPATHY, S. K.; MISHRA, A. Facile bio-synthesis of gold nanoparticles by using extract of *Hibiscus sabdariffa* and evaluation of its cytotoxicity against U87 glioblastoma cells under hyperglycemic condition. **Biochemical Engineering Journal**, v. 105, p. 264–272, 2016.
- MITTAL, A. K.; CHISTI, Y.; BANERJEE, U. C. Synthesis of metallic nanoparticles using plant extracts. **Biotechnology Advances**, v. 31, n. 2, p. 346–356, 2013.
- MLALILA, N. G.; SWAI, S. H.; AKWAR, H.; KADAM, D. M. Antimicrobial dependence of silver nanoparticles on surface plasmon resonance bands against *Escherichia coli*. **Nanotechnology, Science and Applications**, v. 10, p. 1–9, 2017.

MOHAMED, J.; SHING, S. W.; IDRIS, M. H. M.; BUDIN, S. B.; ZAINALABIDIN, S. The protective effect of aqueous extracts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. UKMR-2) against red blood cell membrane oxidative stress in rats with streptozotocin-induced diabetes. **Clinics**, v. 68, n. 10, p. 1358–1363, 2013.

MOHAMED, J.; NOR, N. A. M.; BUDIN, S. B. Effect of aqueous extract of Roselle calyx (*Hibiscus sabdariffa* Linn) on hydrogen peroxide induced oxidative stress of rat red blood cell membranes. **International Journal of Collaborative Research on Internal Medicine e Public Health**, v. 4, n. 12, p. 2111–2127, 2012.

MOHD-ESA, N. HERN, F. S.; ISMAIL, A.; YEE, C. L. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. **Food Chemistry**, v. 122, n. 4, p. 1055–1060, 2010.

MOLINA-OCAMPO, L. B.; VALLADARES-CISNEROS, M. G.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, J. G. Using *Hibiscus sabdariffa* as corrosin inhibitor for Al in 0.5 M. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 10, p. 388–403, 2015.

MUNGOLE, A.; CHATURVEDI, A. *Hibiscus sabdariffa* L. a rich source of secondary metabolites. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 6, n. 1, p. 83–87, 2011.

MURRAY, A. P.; FARAONI, M. B.; CASTRO, M. J.; ALIZA, N. P.; CAVALLARO, V. Natural AChE inhibitors from plants and their contribution to Alzheimer's disease therapy. **Current Neuropharmacology**, v. 11, p. 388–413, 2013.

MUTHU, K.; PRIYA, S. S. Green synthesis, characterization and catalytic activity of silver nanoparticles using *Cassia auriculata* flower extract separated fraction. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 179, p. 66–72, 2017.

NURKHASANA; MUHAMMAD, R. R. R. Hepatoprotective effect of *Hibiscus sabdariffa* L. extract on 7, 12-dimethylbenz (α) anthracene (dmba) Induced Rat. **International Journal of Biological and Medical Research**, v. 6, n. 1, p. 4705–4708, 2015.

OBOH, G.; NWANNA, E. E.; OYELEYE, S. I.; OLASEHINDE, T. A.; OGUNSUYI, O. B.; BOLIGON, A. A. *In vitro* neuroprotective potentials of aqueous and methanol extracts from *Heinsia crinita* leaves. **Food Science and Human Wellness**, v. 5, n. 2, p. 95–102, 2016.

OBOH, G.; ADEWUNI, T. M.; ADEMILUYI, A. O.; OLASEHINDE, T. A.; ADEMOSUN, A. O. Phenolic constituents and inhibitory effects of *Hibiscus sabdariffa* L. (sorrel) calyx on cholinergic, monoaminergic, and purinergic enzyme activities. **Journal of Dietary Supplements**, p. 1–13, 2018.

OBOUAYEBA, A. P.; DIARRASSOUBA, M.; SOUMAHIN, E. F.; KOUAKOU, T. H. Phytochemical analysis, purification and identification of *Hibiscus* anthocyanins. **Journal of Pharmaceutical, Chemical and Biological Sciences**, v. 3, n. 2, p. 156–168, 2015.

OBOUAYEBA, A. P.; DJYH N. B.; DIABATE, S.; DJAMAN, A. J.; N'GUESSAN, J. D.; KONE, M.; KOUAKOU, T. H. Phytochemical and antioxidant activity of roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.). **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 5, n. 2, p. 1453–1465, 2014.

OCHANI, P. C.; MELLO, P. D. Antioxidant and antihyperlipidemic activity of *Hibiscus sabdariffa* Linn. leaves and calyces extracts in rats. **Indian Journal of Experimental**

Biology, v. 47, p. 276–282, 2009.

OKEREKE, C.; IROKA, F.; CHUKWUMA, M. Phytochemical analysis and medicinal uses of *Hibiscus sabdariffa*. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 2, n. 6, p. 16–19, 2015.

OLALEYE, T. M. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 1, n.1, p. 9–13, 2007.

OLASEHINDE, T. A.; OLANIRAN, A. O.; OKOH, A. I. Therapeutic potentials of microalgae in the treatment of Alzheimer's disease. **Molecules**, v. 22, n. 480, p. 1–18, 2017.

OLIVEIRA, V. B.; ZUCHETTO, M.; OLIVEIRA, C. F.; PAULA, C. S.; DUARTE, A. F. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *dicksonia sellowiana* (presl.). Hook, dicksoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 18, n. 1, p. 230–239, 2016.

PAIM, M. P.; MACIEL, M. J.; WESCHENFELDER, S.; BERGMANN, G. P.; AVANCINI, C. A. M. Anti-*escherichia coli* effect of *Hibiscus sabdariffa* L. in a meat model. **Food Science and Technology**, v. 37, n. 4, p. 647–650, 2017.

PAPANDREOU, M. A.; DIMAKOPOULOU, A.; LINARDAKI, Z. I.; CORDOPATIS, P.; KLIMIS-ZACAS, D.; MARGARITY, M.; LARAMI, F. N. et al. Effect of a polyphenol-rich wild blueberry extract on cognitive performance of mice, brain antioxidant markers and acetylcholinesterase activity. **Behavioural Brain Research**, v. 198, p. 352–358, 2009.

PARHIZ, H.; ROOHBAKHSH, A.; SOLTANI, F.; REZAEI, R. Antioxidant and anti-inflammatory properties of the citrus flavonoids hesperidin and hesperetin: an updated review of their molecular mechanisms and experimental models. **Phytotherapy Research**, v. 29, p. 323–331, 2015.

PASCHOALINO, M. P.; MARCONE G. P. S.; JARDIM, W. F. Os nanomateriais e a questão ambiental. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 421–430, 2010.

PATEL, J. D.; PANCHAL, U.; MAKWANA, B. A. Green synthesis of silver nanoparticles using the leaf extracts and their microbial activity. **Journal of Advanced Chemical Sciences**, v. 1, n. 3, p. 82–85, 2015.

PHULL, A.; ABBAS, Q.; ALI, A.; RAZA, H.; JA, S.; ZIA, M.; HAQ, I. Antioxidant, cytotoxic and antimicrobial activities of green synthesized silver nanoparticles from crude extract of *Bergenia ciliata*. **Future Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 2, n. 1, p. 31–36, 2016.

PING, Y.; ZHANG, J.; XING, T.; CHEN, G.; TAO, R.; CHOO, K. Green synthesis of silver nanoparticles using grape seed extract and their application for reductive catalysis of direct orange 26. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 58, p. 74–79, 2018.

PIZZINO, G.; IRRERA, N.; CUCINOTTA, M.; PALLIO, G.; MANNINO, F.; ARCORACI, V.; SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; BRITTO, A. Oxidative stress: harms and benefits for human health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, p. 1–12, 2017.

POLJŠAK, B.; RASPOR, P. The antioxidant and pro-oxidant activity of vitamin C and trolox

in vitro: a comparative study. **Journal of Applied Toxicology**, v. 28, p. 183–188, 2008.

PUTSHAK'A, J. D. ADAMU, K. I.; TANKO, F. S.; IYUN, R. O. Application of infusion from leaf of *Hibiscus sabdariffa* in delimiting. **Journal of the American Leather Chemists Association**, v. 108, n. 1, p. 11–15, 2013.

QUELEMES, P. V.; ARARUNA, F. B.; FARIA, B. E. F.; KUCKELHAUS, S. A. S.; SILVA, D. A.; MENDONÇA, R. Z.; EIRAS, C.; SOARES, M. J. S.; LEITE, J. R. S. A. Development and antibacterial activity of cashew gum-based silver nanoparticles. **International Journal of Molecular Science**, v. 14, p. 4969–4981, 2013.

RAI, M.; YADAV, A.; GADE, A. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials. **Biotechnology Advances**, v. 27, n. 1, p. 76–83, 2009.

RAMOS, D. D.; VIEIRA, M. C. FORMAGIO, A. S. N.; CARDOSO, C. A. L.; RAMOS, D. D.; CARNEVALI, T. O. Atividade antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica. **Ciência Rural**, v. 41, n. 8, p. 1331–1336, 2011.

RANGEL-VARGAS, E.; GUTIÉRREZ-ALCÁNTARA, E. J.; GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; FALFÁN-CORTÉS, R. N.; SEGOVIA-CRUZ, J. A.; SALAS-RANGEL, L. P.; CASTRO-ROSAS, J. Antibacterial activity of roselle calyx extracts, sodium hypochlorite, colloidal silver and acetic acid against multidrug-resistant *salmonella* serotypes isolated from coriander. **Journal of Food Safety**, v. 37, p. 1–8, 2017.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 26, n. 9–10, p. 1231–1237, 1999.

ROCHA, L. G. ALMEIDA, J. R. G. S. MACÊDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, p. 514–535, 2005.

ROSA, E. DA S. R. **Características nutricionais e fitoquímicas em diferentes preparações e apresentações de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco, vinagreira, rosela, quiabo-de-angola, caruru-da-guiné) - Malvaceae**. 2013. 45f. Trabalho de conclusão de curso (Bacharelado em Nutrição) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

RUKAYADI, Y.; SHIM, J.; HWANG, J. Screening of Thai medicinal plants for anticandidal activity. **Mycoses**, v. 51, p. 308–312, 2008.

SAHA, P.; MUKHOPADHYAY, D.; CHATTERJEE, M. Immunomodulation by chemotherapeutic agents against Leishmaniasis. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1668–1679, 2011.

SALAZAR-GONZÁLEZ, C.; VERGARA-BALDERAS, F. T.; ORTEGA-REGULES, A. E.; GUERRERO-BELTRÁN, J. A. Antioxidant properties and color of *Hibiscus sabdariffa* extracts. **Ciencia e investigación agraria**, v. 39, n. 1, p. 79–90, 2012.

SAMPAIO, B. L.; EDRADA-EBEL, R.; COSTA, F. B. Effect of the environment on the secondary metabolic profile of *Tithonia diversifolia*: a model for environmental metabolomics of plants. **Scientific Reports**, v. 6, n. 29265, p. 1–11, 2016.

- SARAIVA, C.; PRAÇA, C.; FERREIRA, R.; SANTOS, T.; FERREIRA, L.; BERNARDINO, L. Nanoparticle-mediated brain drug delivery: overcoming blood – brain barrier to treat neurodegenerative diseases. **Journal of Controlled Release**, v. 235, p. 34–47, 2016.
- SEN, R.; CHATTERJEE, M. Phytomedicine plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine**, v. 18, p. 1056–1069, 2011.
- SEUNG, T. W.; PARK, S. H.; PARK, S. K.; HA, J. S.; LEE, D. S.; KANG, J. Y.; KIM, J. M.; LEE, U.; HEO, H. J. Protective effect of ethyl acetate fraction from *Hibiscus sabdariffa* L. extract against high glucose-induced oxidative stress. **Korean Journal of Food Science and Technology**, v. 48, n. 3, p. 284–288, 2016.
- SHAH, S.; DIN, S.; KHAN, A.; REHMANULLAH; Shah, S. A. Green synthesis and antioxidant study of silver nanoparticles of root extract of *Sageretia thea* and its role in oxidation protection technology. **Journal of Polymers and the Environment**, p. 1–10, 2017.
- SILVA, A. D.; MIRANDA, C. A. S.; MIRANDA, F. A. N.; OLIVEIRA, M. F. Prática alternativa da fitoterapia associada ao programa de crescimento e desenvolvimento: reparações para um grupo de mães de desnutridos. **Unopar Científica. Ciências biológicas e da saúde**, v. 2, n. 1, p. 67–76, 2000.
- SINDI, H. A.; MARSHALL, L. J.; MORGAN, M. R. A. Comparative chemical and biochemical analysis of extracts of *Hibiscus sabdariffa*. **Food Chemistry**, v. 164, p. 23–29, 2014.
- SINGH, M.; RAMASSAMY, C. *In vitro* screening of neuroprotective activity of indian medicinal plant *Withania somnifera*. **Journal of Nutritional Science**, v. 6, n. 54, p. 7–11, 2017.
- SINGLETON, V L; ROSSI, J. A.; JR, J. Colorimetry of total phenolics with acid reagents. **American Journal of Enology & Viticulture**, v. 16, p. 144–158, 1965.
- SOARES, D. C.; PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A.; SARAIVA, E. M. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International**, v. 56, n. 2. p. 135-139, 2007.
- SOARES, T. S. C. **Efeito de nanopartículas de prata em neutrófilos humanos**. 2014. 92f. Dissertação de mestrado (Controle de qualidade) - Universidade do Porto.
- SOBOTA, J. D. F.; PINHO, M. G.; OLIVEIRA, V. B. Perfil físico-químico e atividade antioxidante do cálice da espécie *Hibiscus sabdariffa* L. a partir do extrato aquoso e alcoólico obtidos por infusão e decocto. **Revista Fitos**, v. 10, n. 1, p. 33–46, 2016.
- SUBRAMANIAN, R.; SUBBRAMANIYAN, P.; RAJ, V. Antioxidant activity of the stem bark of *Shorea roxburghii* and its silver reducing power. **SpringerPlus**, v. 2, n. 28, p. 1–11, 2013.
- SUDHA, A.; JEYAKANTHAN, J.; SRINIVASAN, P. Green synthesis of silver nanoparticles using *Lippia nodiflora* aerial extract and evaluation of their antioxidant , antibacterial and cytotoxic effects. **Resource-Efficient Technologies**, v. 3, p. 506–515, 2017.
- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: an update of current pharmacotherapy. **Expert Opinion**, v. 14, n. 1, p. 53–63, 2013.
- THOVHOGI, N.; DIALLO, A.; GURIB-FAKIN, A; MAAZA, M. Nanoparticles green

- synthesis by *Hibiscus sabdariffa* flower extract: main physical properties. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 647, p. 392–396, 2015.
- THOVHOZI, N.; PARK, E.; MANINKANDAN, E.; MAAZA, M.; GURIB-FAKIM, A. Physical properties of CdO nanoparticles synthesized by green chemistry via *Hibiscus sabdariffa* flower extract. **Journal of Alloys and Compounds**, v. 655, p. 314–320, 2016.
- TIPPAYAWAT, P.; PHROMVIYO, N.; BOUEROY, P. Green synthesis of silver nanoparticles in aloe vera plant extract prepared by a hydrothermal method and their synergistic antibacterial activity. **PeerJ**, p. 1–15, 2016.
- USOH, I. F.; AKPAN, E. J.; ETIM, E. O.; FAROMBI, E. O. Antioxidant actions of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. on sodium arsenite - induced oxidative stress in rats. **Pakistan Journal of Nutrition**, v. 4, n. 3, 2005.
- VALADARES, D. G.; DUARTE, M. C.; OLIVEIRA, J. S.; CHÁVEZ-FUMAGALLI, M. A.; MARTINS, V. T.; COSTA, L. E.; LEITE, J. P.; SANTORO, M. M.; RÉGIS, W. C.; TAVARES, C. A.; COELHO, E. A. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitology International**, v. 60, n. 4. p. 357-363, 2011.
- VILLANI, T.; JULIANI, H. R.; SIMON, J. E.; WU, Q. *Hibiscus sabdariffa*: phytochemistry, quality control, and health properties. **African Natural Plant Products**, v. II, 2013.
- VINAYAGAM, R.; VARADAVENKATESAN, T.; SELVARAJ, R. Green synthesis, structural characterization, and catalytic activity of silver nanoparticles stabilized with *Bridelia retusa* leaf extract. **Green Process Synth**, p. 1–8, 2017.
- WANG, J.; CAO, X.; JIANG, H.; QI, Y.; CHIN, K. L.; YUE, Y. Antioxidant activity of leaf extracts from different *Hibiscus sabdariffa* accessions and simultaneous determination five major antioxidant compounds by LC-Q-TOF-MS. **Molecules**, v. 19, p. 21226–21238, 2014.
- WANG, J.; GU, H. Novel metal nanomaterials and their catalytic applications. **Molecules**, v. 20, p. 17070–17092, 2015.
- WEI, L.; LU, J.; XU, H.; PATEL, A.; CHEN, Z.; CHEN, G. Silver nanoparticles: synthesis, properties, and therapeutic applications. **Drug Discovery Today**, v. 20, n. 5, p. 595–601, 2015.
- WHO. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis. **WHO Technical Report Series**, v. 949, p. 22–26, 2010.
- YANG, L.; GOU, Y.; ZHAO, T.; ZHAO, J.; LI, F.; ZHANG, B.; WU, X. Antioxidant capacity of extracts from calyx fruits of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 17, p. 4063–4068, 2012.
- ZAAROUR, M.; ROZ, M. E.; DONG, B.; RETOUX, R.; AAD, R.; CARDIN, J.; DUFOUR, C.; GOUBILLEAU, F.; GILSON, J.; MINTOVA, S. Photochemical Preparation of Silver Nanoparticles Supported on Zeolite Crystals. **Langmuir**, v. 30, n. 21, p. 6250 - 6256, 2014.
- ZAINALABIDIN, S.; SHAHIDIN, S. N. F. S. N.; BUDIN, S. B. *Hibiscus sabdariffa* Linn. (roselle) protects against nicotine-induced heart damage in rats. **Sains Malaysiana**, v. 45, n. 2, p. 207–214, 2016.
- ZHANG, B.; MAO, G.; ZHENG, D.; ZHAO, T.; ZOU, Y.; QU, H.; LI, F.; ZHU, B.; YANG,

L. Separation, identification, antioxidant, and anti-tumor activities of *Hibiscus sabdariffa* L. extracts. **Separation Science and Technology**, v. 49, n. 9, p. 1379–1388, 2014.

ZHEN, J.; VILLANO, T. S.; GUO, Y.; QI, Y.; CHIN, K.; PAN, M.; HO, C.; SIMON, J. E.; WU, Q. Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdariffa* leaves. **Food Chemistry**, v. 190, p. 673–680, 2016.

ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W. The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. **Food Chemistry**, v. 64, n. 4, p. 555-559, 1999.

ZHOU, M.; ZHANG, J. Occurrence, ecological and human health risks, and seasonal variations of phenolic compounds in surface water and sediment of a potential polluted river basin in China. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 14, n. 1140, p. 1–14, 2017.