



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
(PPGCTA)

**AVALIAÇÃO DO EXTRATO ALCOÓLICO DE HIBISCO (*Hibiscus
sabdariffa* L.) COMO FATOR DE PROTEÇÃO ANTIBACTERIANA E
ANTIOXIDANTE EM ALIMENTOS**

Mônica Jachetti Maciel

Porto Alegre, fevereiro de 2011

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS
(PPGCTA)

Mônica Jachetti Maciel
(Licenciada em Ciências Biológicas – UNIVATES)

Dissertação apresentada ao Curso de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos como um dos requisitos para
obtenção do grau de Mestre em Ciência e
Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. José Maria Wiest

Co-orientadora: Dra. Heloísa Helena Chaves
Carvalho

Porto Alegre, fevereiro de 2011

M152a Maciel, Mônica Jachetti
Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.)
como fator de proteção antibacteriana e antioxidante em alimentos. /
Mônica Jachetti Maciel. -- Porto Alegre, 2011.

62f. : il.

Dissertação (mestrado) - Programa de Pós-graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, BR-RS,
2011.

Orientador: José Maria Wiest

Co-orientadora: Heloísa Helena Chaves Carvalho

Bibliografia

1. Alimentos funcionais 2. Conservantes 3. Antioxidantes I.
Título. II. Wiest, José Maria (Orient.). III. Carvalho, Heloísa Helena
Chaves (Co-orient.)

CDU 664.1.03

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca do Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos
da UFRGS.

Mônica Jachetti Maciel
(Licenciada em Ciências Biológicas – UNIVATES)

DISSERTAÇÃO
**Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus*
sabdariffa L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante em
alimentos**

Submetida como parte dos requisitos para obtenção do grau de

MESTRE EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS.

Programa de Pós- graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA)
Universidade Federal do Rio Grande do Sul - Porto Alegre, RS, Brasil.

Aprovada em..../..../.....

Pela Comissão Organizadora:

Prof. Dr. Cesar Augusto Marchinatti
Avancini

Faculdade de Veterinária/UFRGS

Prof. Dr. José Maria Wiest

Orientador – PPGCTA/UFRGS

Homologada em..../..../.....

Por:

Dra. Heloisa Helena Chaves Carvalho

Co-orientadora – PPGCTA/UFRGS

Prof. Dr. José Maria Wiest

Coordenador do Programa de Pós Graduação
em Ciência e Tecnologia de Alimentos
(PPGCTA)

Prof. Dra. Isa Beatriz Noll

Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimento
ICTA/UFRGS

Prof. Dr. Vitor Manfro

Prof. Dra. Ingrid B. Inchausti de Barros
Faculdade de Agronomia/UFRGS

Diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de
Alimentos ICTA/UFRGS

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todas as oportunidades colocadas em meu caminho e por ter me dado forças para não desistir.

Ao professor e orientador José Maria Wiest, que me deu a possibilidade de ver o mundo como eu jamais havia visto. Obrigada pela paciência, pelo apoio, pelos mais variados conhecimentos, além da sua dedicação e competência para a realização deste trabalho.

A minha co-orientadora Heloisa Helena Chaves Carvalho pelo apoio e ajuda na realização deste trabalho.

A todos os professores do Curso de Mestrado que de alguma forma contribuíram para a minha formação.

Aos meus colegas e amigos de trabalho do Laboratório de Higiene de Alimentos: Camila, Géssica, Mariana, Mirela, Cláudia, Felícia, Giovani, Marcelo e Simone pela amizade.

À bióloga Silvia Marodin pela identificação botânica dos acessos de hibisco.

Às oportunidades que me foram dadas pela UNIVATES para um início de um amor sem fim (microbiologia), em especial a professora Rosângela Salvatori, Hans, Cláudia e Tainá.

A UFRGS por me dar essa grande oportunidade de estudo.

Aos meus pais Milton Antonio e Maria Helena e ao meu irmão Marcio pela educação, pelo incentivo constante ao estudo e por estarem ao meu lado sempre. A vocês, minha gratidão eterna.

Ao meu amor Gustavo que durante a concretização deste sonho esteve todos os dias ao meu lado me apoiando.

*Dedico este trabalho, com muito
carinho aos meus queridos
pais Milton e Maria Helena,
ao meu irmão Márcio e ao
meu namorado Gustavo.*

Título: Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante em alimentos

Autora: Mônica Jachetti Maciel

Orientador: Prof. Dr. José Maria Wiest

Co-orientador: Dra. Heloisa Helena Chaves Carvalho

RESUMO

O hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) além de possuir propriedades antioxidantes e antimicrobianas, é utilizado como planta medicinal e alimento funcional nos países tropicais. Através de Testes de Diluição em Sistema de Tubos Múltiplos determinou-se a Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB/Bacteriostasia) e a Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB/Bactericidia) de extrato alcoólico de dois acessos de hibisco, a saber: Palmares do Sul/RS e Porto Alegre/RS sobre inóculos padronizados de *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Paralelamente, o teor de polifenóis totais e de antocianinas nos cálices e nos frutos com sementes do hibisco foi determinado. A atividade antimicrobiana do extrato alcoólico de cálices, em ambos os acessos, apresentou diferença positiva significativa quando relacionada ao extrato alcoólico dos frutos com sementes. *Salmonella* Enteritidis foi a bactéria mais sensível ao extrato alcoólico de cálices do hibisco enquanto a mais resistente foi *Staphylococcus aureus*, independente da variável acesso, considerando somente a estrutura vegetal. Em relação ao extrato alcoólico dos frutos com sementes, *Escherichia coli* demonstrou a maior sensibilidade e *Staphylococcus aureus* a maior resistência. Os valores de polifenóis totais e de antocianinas do extrato alcoólico de cálices apresentaram diferença significativa entre si e foram superiores ao extrato alcoólico dos frutos com sementes. Possivelmente existe uma relação direta entre a concentração de antocianina e a atividade antibacteriana em diferentes estruturas vegetais do hibisco.

Palavras- chave: *Hibiscus sabdariffa* L., inibição bacteriana, inativação bacteriana, polifenóis totais, antocianinas.

Evaluation of the alcoholic extract of hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) as a protective antibacterial and antioxidant in food

ABSTRACT

The hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) has antioxidant and antimicrobial properties and it is utilized as functional food and medicinal plant in tropical countries. Through of Dilution Testing in Multiple Tubes System, it were determined the intensity of bacterial inhibition activity (IINIB/ Bacteriostasy) and the intensity of bacterial inactivation activity (IINAB/ Bactericidie) of alcoholic extracts of two accesses of hibiscus, known as: Palmares do Sul/RS and Porto Alegre/RS on standardized inoculum of *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). At the same time, the total content of polyphenols and anthocyanins in the calyxes and fruits with seeds hibiscus was determined. The antimicrobial activity of alcoholic extract of the calyxes in both accesses showed a significant positive difference when related to the alcoholic extract of the fruits with seeds. *Salmonella enteritidis* was the most sensitive bacteria to the alcoholic extract of calyxes of the hibiscus while the most resistant was *Staphylococcus aureus*, independent of the variable access, considering only the plant structure. In relation to the alcoholic extract of the fruits with seeds, *Escherichia coli* showed the highest sensitivity and *Staphylococcus aureus* the highest resistance. Total polyphenols and anthocyanins of alcoholic extract of calyxes's values showed a significant difference and they were superior to alcohol extract of fruits with seeds. Possibly there is a direct relationship between the concentration of anthocyanin and antibacterial activity in different structures of the hibiscus plant.

Key words: *Hibiscus sabdariffa* L., bacterial inhibition, bacterial inactivation, total polyphenols, anthocyanins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

| | |
|--------------------------------------|----|
| Figura 1- Morfologia do hibisco..... | 16 |
|--------------------------------------|----|

LISTA DE GRÁFICOS

Capítulo 3

| | |
|---|----|
| Gráfico 1- Análise da sensibilidade de quatro espécies bacterianas de interesse em alimentos frente à soluções conservantes alcoólicas de cálices e frutos com sementes de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (hibisco), independente dos fatores de tempo de confrontação, presença ou ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos e acesso. | 48 |
|---|----|

| | |
|--|----|
| Gráfico 2- Análise da sensibilidade de quatro espécies bacterianas de interesse em alimentos frente à soluções conservantes dois acessos de cálices e frutos com sementes de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (hibisco), independente dos fatores de tempo de confrontação, presença ou ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos. | 49 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Gráfico 3- Análise da presença ou da ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extrato alcoólico de cálices de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (hibisco), em dois acessos, independente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas..... | 50 |
|--|----|

| | |
|--|----|
| Gráfico 4- Análise da presença ou da ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana do extrato de frutos com sementes de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (hibisco), em dois acessos, independente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas..... | 51 |
|--|----|

| | |
|---|----|
| Gráfico 5 – Análise da quantidade de polifenóis totais e antocianinas nos extratos alcoólicos das diferentes estruturas vegetais do <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (hibisco), independente acesso..... | 52 |
|---|----|

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

- Tabela 1- Representação dos valores ordinais arbitrários de intensidade de atividade atribuídos às variáveis Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/ Bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/ Bactericidia (IINAB) e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos.....32
- Tabela 2- Análise da sensibilidade de quatro espécies bacterianas de interesse em alimentos frente à soluções conservantes de dois acessos de cálices e de frutos com sementes de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), independente dos fatores de tempo de confrontação, presença ou ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos36
- Tabela 3- Análise da presença e da ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extrato alcoólico de cálices de dois acessos de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), independente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas.....37
- Tabela 4- Análise da presença e da ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extrato alcoólico de frutos com sementes de dois acessos de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), independente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas.....38
- Tabela 5- Análise da relação entre as diferentes estruturas vegetais de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), a atividade antibacteriana, a quantidade de polifenóis e antocianinas, independente dos fatores tempo de confrontação, acesso e espécie bacteriana de interesse alimentar e da presença ou da ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extrato alcoólico de *Hibiscus sabdariffa* L.40

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| CAPÍTULO 1..... | 11 |
| 1. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 1.1 Objetivo geral..... | 13 |
| 1.2 Objetivos específicos..... | 13 |
| 1.3. Revisão bibliográfica..... | 14 |
| 1.3.1 Plantas condimentares e medicinais..... | 14 |
| 1.3.1.1 O hibisco | 15 |
| 1.3.1.1.1 Os cálices do hibisco..... | 17 |
| 1.3.1.1.2 Os frutos com sementes do hibisco..... | 17 |
| 1.3.1.1.3 O extrato alcoólico de hibisco..... | 18 |
| 1.3.1.1.4 Atividade antibacteriana do hibisco..... | 19 |
| 1.3.1.1.5 Atividade antioxidante do hibisco..... | 20 |
| 1.3.2 Microrganismos..... | 21 |
| 1.3.2.1 <i>Escherichia coli</i> | 21 |
| 1.3.2.2 <i>Enterococcus</i> | 22 |
| 1.3.2.3 <i>Staphylococcus</i> | 22 |
| 1.3.2.4 <i>Salmonella</i> | 23 |
| CAPÍTULO 2..... | 24 |
| Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante em alimentos..... | 25 |
| INTRODUÇÃO..... | 27 |
| MATERIAL E MÉTODO..... | 29 |
| RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 34 |
| AGRADECIMENTOS..... | 42 |
| REFERÊNCIAS..... | 42 |
| CAPÍTULO 3..... | 47 |
| 3. REAPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS | 48 |
| 3.1 Sensibilidade bacteriana..... | 48 |
| 3.2 Presença ou ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana..... | 50 |
| 3.3 Teores de polifenóis totais e antocianinas e a atividade antimicrobiana dos extratos alcoólicos das diferentes estruturas de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.(hibisco)..... | 52 |
| REFERÊNCIAS GERAIS..... | 53 |
| APÊNDICE A..... | 61 |

CAPÍTULO 1

Introdução, Objetivos e Revisão Bibliográfica.

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem havido uma intensa preocupação pela disponibilidade de uma alimentação de qualidade e natural (GOULD, 1995), os alimentos que contém altos níveis de conservantes para redução da carga microbiana são indesejáveis. A pressão por parte dos consumidores se volta para uma produção maior de alimentos frescos, com conservantes naturais e uma maior garantia de segurança (FORSYTHE, 2002).

Existe um grande interesse em substituir os conservantes artificiais por conservantes naturais nos alimentos. As substâncias naturais, de origem vegetal tornam o alimento mais atrativo ao consumidor (PEREIRA et al., 2006), além de aumentar a sua vida útil pela capacidade bacteriostática e bactericida, retardando o começo da deterioração e o crescimento de microrganismos indesejáveis (SOUZA, 2003). O uso inadequado de antibióticos sintéticos faz com que microrganismos patogênicos apresentem resistência a medicamentos, havendo a necessidade de novos antimicrobianos de fontes naturais (SARTORATTO et al., 2004). O mesmo ocorre com os antioxidantes sintéticos, restritos tanto pela sua aplicação quanto pela sua quantidade (PENG et al., 2005).

Conhecido popularmente como vinagreira, rosela, caruru-azedo, azedinha, caruru-da-guiné, azeda-da-guiné, quiabo-azedo, quiabo-róseo, quiabo-roxo, rosela, rosélia, groselha, quaibo-de-angola, groselheira (LORENZI E MATOS, 2002), o hibisco é uma espécie vegetal da família *Malvaceae* proveniente da África Oriental (MARTINS et al., 1994) e foi introduzido ao Brasil pelos escravos (PANIZZA, 1997).

O hibisco pode atingir mais de 1,80m de altura, é pouco ramificado e com a forma de taça de tonalidade vermelha (MCCALED, 1998). Cultivado em regiões tropicais e subtropicais (ALONSO, 1998). Sua corola é composta por cinco sépalas de intensa coloração vermelha em forma de cone que forma o cálice. Na base do cálice está o calículo ou o pequeno cálice disposto em círculo (CASTRO et al., 2004). A cápsula deiscente é o fruto que possui um aspecto aveludado e cerca de 2 cm de comprimento, abrigando as sementes (MAHADEVAN et al., 2009; DUKE, 1978). O termo “cálice” neste trabalho envolve o cálice propriamente dito e o pequeno cálice ou calículo. O termo “fruto com semente” envolve a cápsula deiscente e as sementes.

O hibisco é um alimento funcional nos países da Ásia (Japão, China, Coréia e Taiwan) (LIU et al., 2005). O interesse econômico está nos cálices desidratados, utilizados mundialmente para a produção de bebidas, alimentos (D' HEUREX-CALIX & BADRIE, 2004), conservantes (LIU et al., 2005) e antioxidantes (WANG et al., 2000). As sementes do fruto do hibisco surgem como um subproduto concomitante ao cultivo em larga escala e a exploração comercial da planta (VILCHE et al., 2003). Estas estruturas vegetais podem ser uma fonte de antioxidantes. Ao serem trituradas, servem na alimentação humana como uma fonte expressiva de proteína e se torradas, são substitutas do café (MORTON, 1987).

Alguns autores, como Chao & Yin (2009), relatam uma possível relação entre a quantidade de antocianinas e a atividade antimicrobiana do hibisco.

1.1 Objetivo geral

A partir de conhecimentos tradicionais, fundamentar o desenvolvimento de alimentos seguros pelo uso de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco) como conservante antibacteriano e antioxidante.

1.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade bacteriostática/inibição e bactericida/inativação “*in vitro*” do extrato alcoólico de duas estruturas vegetais de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), quais sejam os cálices e frutos com sementes, obtidas de dois diferentes acessos (Lami, Porto Alegre/RS e Bacupari, Palmares do Sul/RS), no princípio de droga crua, através de testes de diluição e suspensão em sistema de tubos múltiplos sobre os seguintes microrganismos padrões de interesse em alimentos, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis e *Staphylococcus aureus*.
- Determinar e avaliar a relação entre antioxidantes (polifenóis totais e antocianinas) presentes nas diferentes estruturas vegetais, cálices e frutos com sementes, com o poder antibacteriano de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco).

1.3 Revisão bibliográfica

1.3.1 Plantas condimentares e medicinais

As plantas aromáticas, condimentares, ou especiarias são usadas com fins aromatizantes e também como conservantes de alimentos (AURELI, 1992). Os condimentos vegetais podem aumentar a vida útil dos alimentos através da sua atividade bacteriostática e bactericida, retardando o começo da deterioração e o crescimento de microrganismos indesejáveis, interferindo significativamente na epidemiologia e profilaxia de surtos toxinfecivos alimentares (SOUZA, 2003). Além destas utilidades, possuem propriedades antioxidantes e medicinais (SHELEF, 1983). As culturas antigas já reconheciam o valor das plantas na preservação de alimentos e o seu uso medicinal (SHELEF, 1983; ZAICA, 1988). As plantas medicinais são utilizadas para uma ampla variedade de efeitos em diversas partes do mundo. Os extratos e óleos são a base de muitas aplicações, incluindo a conservação de alimentos crus, de processados, na medicina, em alternativas farmacêuticas e nas terapias naturais (BAYTOP, 1984; HAMBURGER et al., 1991). As plantas têm contribuído, ao longo dos anos, para a obtenção de vários fármacos (TESKE et al., 1995). Cerca de 75% dos compostos puros naturais empregados na indústria farmacêutica foram isolados seguindo recomendações da medicina popular (JÚNIOR & VIZZOTTO, 1996).

Outro aspecto a ser ressaltado é a quantidade de espécies vegetais existentes no planeta, sendo que a maioria é desconhecida sob o ponto de vista científico; onde entre 250-500 mil espécies, somente cerca de 5% têm sido estudadas fitoquimicamente e uma porcentagem menor avaliadas sob os aspectos biológicos (BRAZ-FILHO, 1994).

Recentemente, a atividade antimicrobiana de diversos extratos tem sido estudada contra muitos microrganismos. Carvalho et al., 2005, avaliou a atividade antibacteriana em plantas condimentares frente a microrganismos como *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) e *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433). Dentre as trinta e duas plantas testadas sete tiveram destaque quanto a atividade antibacteriana: alho nirá, alho porro, estragão, pimenta dedo-de-moça, pimenta de jardim, pimenta malagueta e a sálvia. Estas plantas poderiam fazer parte de ações de saúde, prevenindo e controlando toxinfecções alimentares.

Asolini et al. (2006) testaram a atividade antioxidante e antibacteriana dos compostos fenólicos dos extratos de plantas usadas como chás. O estudo envolveu plantas como arruda (*Ruta graveolens*), camomila (*Matricaria chamomilla*), macela (*Achyrocline satureioides*), alcachofra (*Cynara scolymus*), erva-mate (*Ilex paraguariensis*), tanchagem (*Plantago major*), malva (*Malva silvestris*), sálvia (*Salvia officinalis*), capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e alecrim (*Rosmarinus officinalis*). As bactérias utilizadas foram *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*. Somente o extrato aquoso da alcachofra apresentou atividade antibacteriana frente as quatro bactérias analisadas. Os extratos alcoólicos de todos os chás mostraram o maior halo de inibição para *Staphylococcus aureus*. A quantidade de compostos fenólicos totais extraídos de ambas as condições de extração variou de 18 a 145mg EAG/g de folha seca (EAG – equivalente em ácido gálico). Os extratos aquosos da macela, alecrim, erva-mate e malva apresentaram maior atividade antioxidante (acima de 97%) entre os chás analisados.

Nas últimas décadas as indústrias farmacêuticas produziram um expressivo número de novos antibióticos e a resistência microbiana a essas drogas também aumentou. As bactérias têm a habilidade genética de adquirir e de transmitir resistência às drogas utilizadas como agentes terapêuticos (COHEN, 1992). O problema da resistência microbiana é crescente e torna-se necessário adotar medidas para enfrentar o problema, dentre elas, a continuação dos estudos acerca de novas drogas sintéticas e naturais (NASCIMENTO et al., 2000).

1.3.1.1 Hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.)

Conhecido popularmente como vinagreira, rosela, caruru-azedo, azedinha, caruru-da-guiné, azeda-da-guiné, quiabo-azedo, quiabo-róseo, quiabo-roxo, rosela, rosélia, groselha, quiabo-de-angola, groselheira (LORENZI & MATOS, 2002), o hibisco é uma espécie vegetal da família *Malvaceae* proveniente da África Oriental (MARTINS et al., 1994) e foi introduzido ao Brasil pelos escravos (PANIZZA, 1997).

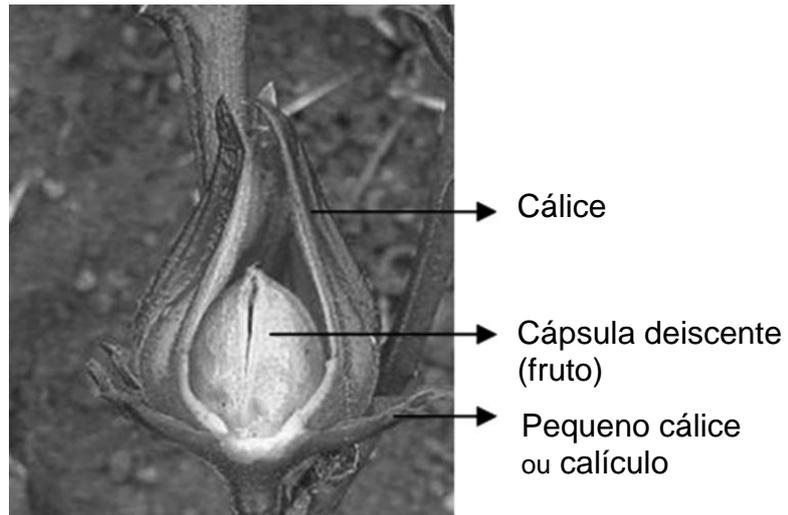


Figura 1- Morfologia do hibisco.

Fonte: adaptada de Castro et al., 2004.

Arbusto de ciclo anual, podendo atingir mais de 1,80m de altura, pouco ramificado, com a forma de taça com tonalidade vermelha (McCALEB, 1998). Cultivado em regiões tropicais e subtropicais, desde o nível do mar até 900 m de altura. A planta requer distribuição de chuva entre 800 e 1600 mm e temperaturas de 18 a 35°C, sendo que a temperatura mínima tolerada varia de 7 a 10°C. O hibisco é muito sensível ao fotoperíodo, variando conforme a cultivar (MARTINS, 1985). A flor é simples, séssil e axilar. Sua corola é composta por cinco sépalas de intensa coloração vermelha em forma de cone que forma o cálice. Na base do cálice está o calículo ou o pequeno cálice disposto em círculo (CASTRO et al., 2004). A cápsula deiscente é o fruto que possui cerca de 2cm de comprimento e abriga as sementes (DUKE, 1978). O termo “cálice” neste trabalho envolve o cálice propriamente dito e o pequeno cálice. O termo “fruto com semente” envolve a cápsula deiscente e as sementes.

O hibisco é um alimento funcional nos países da Ásia (Japão, China, Coréia e Taiwan) (LIU et al., 2005), usado na medicina tradicional para os males da hipertensão, inflamação e na prevenção do câncer. Os responsáveis por esses efeitos são os compostos antioxidantes como as vitaminas E e C, os ácidos polifenólicos, os flavonóides e as antocianinas (WANG et al., 2000). Diversos estudos comprovam os benefícios de saúde associados ao consumo de produtos derivados do hibisco (LIN et al., 2007).

Em muitos países o hibisco é utilizado como decoração e em outros, as sementes e os cálices são utilizadas ao consumo humano. Na maioria dos casos é cultivado para a produção de infusões que são consumidas como chás (DOMÍNGUEZ- LÓPES et al., 2007). A sua cor vermelha brilhante e o seu sabor único o torna um produto alimentício de valor (TSAI & OU, 1996).

1.3.1.1.1 Os cálices do hibisco

Na corola, as sépalas vermelhas formam os cálices do hibisco. Na base do cálice está o cálculo ou o pequeno cálice disposto em círculo de mesma coloração (CASTRO et al., 2004).

O interesse econômico do hibisco está nos cálices desidratados mundialmente para a produção de bebidas (como chás), geléias, molhos, *chutneys*, vinhos, conservantes e corantes (devido a presença de antocianinas) (D' HEUREX-CALIX & BADRIE, 2004). São ricos em vitamina C, antocianinas, beta-caroteno, licopeno, polifenóis e outros antioxidantes solúveis em água (WONG et al., 2002; DUKE & ATCHLEY, 1984). É utilizado como ingrediente em uma bebida típica nigeriana não-alcóolica chamada de “sorrel” (soborodo) (NNAM & ONYEKE, 2003; OBOH & ELUSIYAN, 2004).

O chá do cálice do hibisco é diurético, anti-séptico intestinal e um laxante suave, contra doenças nervosas e cardíacas, pressão alta e artérias calcificadas (FAROMBI & FAKOYA, 2005).

Os extratos aquoso e etanólico são seguros para serem utilizados em um sistema de alimentação evitando a contaminação bacteriana. O cálice contém ácido protocatecuico e outros compostos fenólicos como antocianidinas e ácidos hidroxicinâmicos (FAROMBI & FAKOYA, 2005; SAYAGO-AYERDI et al., 2007). É possível que todos esses compostos fenólicos contribuam com o efeito antibacteriano observado.

1.3.1.1.2 Os frutos com sementes do hibisco

O fruto (cápsula deiscente) é uma cápsula aveludada de 1,25 a 2cm de comprimento, verde quando imatura, contém cinco válvulas com cerca de três a quatro sementes em cada. A cápsula se torna marrom e abre quando maduro. As sementes tem forma de rim, de coloração marrom-clara, 3 a 5 mm de comprimento e

aproximadamente 5 g (MAHADEVAN et al., 2009; WONG et al., 2002). O fruto está localizado no interior da base do cálice (DUKE, 1978).

O grande interesse em se cultivar hibisco está na propriedade antioxidante existente nos cálices das flores (TEE et al., 2002; TSAI et al., 2002; TSAI & HUANG, 2004; TSENG et al., 1997; PRENESTI et al., 2007). Concomitante o cultivo em larga escala e a exploração comercial existe uma enorme quantidade de sementes como subproduto (VILCHE et al., 2003).

Um estudo feito por MOHD-ESA, N. et al. (2010) mostrou que as sementes do hibisco podem ser uma fonte de antioxidantes, aumentando o seu valor comercial. Se assadas, podem ser um substituto do café (MORTON, 1987). No norte da Nigéria, são fermentadas na presença de diversos temperos para o preparo de um alimento tradicional conhecido como Mungza Ntusa (BALAMI, 1998). É também um ingrediente utilizado no Furundu, um prato tradicional do oeste do Sudão, ou “Dadawa baso” na Nigéria, um substituto da carne, onde elas são cozidas e fermentadas por nove dias (YAGOUB et al., 2004; DASHAK et al., 2001).

As propriedades físicas e químicas do óleo da semente do hibisco são semelhantes ao óleo de milho, sendo uma nova fonte de óleo comestível (ATTA & IMAIZUMI, 2002). A sua composição é de 25,2% de proteína de baixo custo, podendo vir a substituir os suplementos dietéticos ou ingredientes alimentares na indústria de alimentos; 21,1% de lipídios, fibra bruta (16,3%), amido (2,2%), cinzas (5,2%), carboidratos totais (26,6%) e umidade (5,5%). Gossipol, que é um composto tóxico presente em sementes de algodão e é encontrado apenas como traços nesta estrutura vegetal do hibisco (DESHPANDE et al., 2000). A análise de ácidos graxos nas sementes revelou que o ácido linoleico, oleico, palmítico e esteárico foram os seus componentes principais e os elementos inorgânicos predominantes: potássio, sódio, magnésio e cálcio (EL-ADAWY & KHALIL, 1994).

Este componente vegetal reduziu o colesterol total e o LDL (lipoproteína de baixa densidade) quando administrados em ratos que continham o colesterol alto (EMMY et al., 2008).

1.3.1.1.3 O extrato alcoólico de hibisco

O uso de extratos vegetais com fins medicinais é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade (GONÇALVES et al., 2005).

Pesquisas realizadas com extratos de hibisco relataram o seu uso na diminuição do colesterol sérico de humanos (LIN et al., 2007) e em animais (HIRUNPANICH et al., 2006). Outros estudos sugerem o uso de extrato de hibisco para proteger o fígado contra o estresse oxidativo (LIU et al., 2006) e exibe efeitos anti-hipertensivos e efeitos cardioprotetores (ODIGIE et al., 2003). Farombi e Ige (2007) testaram os efeitos do extrato etanólico dos cálices secos de hibisco em ratos diabéticos. O extrato de hibisco reduziu fortemente os lipídios atuando como um antioxidante, podendo ser usado na prevenção da aterosclerose e de doenças cardiovasculares associadas ao diabetes.

O extrato de hibisco é usado na medicina tradicional contra a inflamação e na prevenção do câncer. Contém vitaminas E e C, ácidos polifenólicos, flavonóides, antocianinas e são responsáveis por esses efeitos protetores (WANG et al., 2000).

Mohd-Esa et al. (2010), testou a atividade antioxidante de extratos de diferentes estruturas vegetais do hibisco, utilizando o extrato metanólico e aquoso e constatou que os compostos fenólicos são melhores extraídos com álcool do que com água.

Chao & Yin (2009) estudaram os efeitos antibacterianos do extrato aquoso e etanólico de cálice de hibisco e o do ácido protocatecuico na carne moída e no suco de maçã. O ácido protocatecuico teve o melhor efeito antibacteriano, frente aos alimentos testados, seguido do extrato alcoólico e por último ficou o extrato aquoso do hibisco. Uma das hipóteses dos autores é que o extrato alcoólico possui uma maior quantidade de ácido protocatecuico do que o extrato aquoso.

1.3.1.1.4 Atividade antibacteriana do hibisco

Graças a sua atividade metabólica secundária, os vegetais superiores são capazes de produzir substâncias antibióticas, utilizadas como mecanismo de defesa contra predação por microrganismos, insetos e herbívoros (GOTLIEB, 1981). O extrato aquoso e o etanólico do hibisco são utilizados em sistemas alimentares para prevenir a contaminação bacteriana (FAROMBI & FAKOYA, 2005).

Estudos recentes mostraram que o extrato aquoso do hibisco inibe várias bactérias hospitalares infecciosas como as metilina-resistentes como *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae* (LIU et al., 2005). Olaleye em 2007 testou o extrato alcoólico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. como um agente antibacteriano frente aos microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus*

stearothermophilus, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*. O extrato obteve uma excelente atividade antibacteriana frente aos microorganismos testados. A atividade antibacteriana do hibisco pode ser comparada a da Estreptomicina, no entanto a Estreptomicina não inibe *E.coli*. Essas atividades antibacterianas existem, provavelmente, devido a um metabólito secundário presente na planta. Em uma pesquisa realizada por Chao e Yin, em 2009, revelou que o extrato aquoso de cálices do hibisco inibiu bactérias degradantes de alimentos (*S. typhimurium*, *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus* e *B. cereus*), o mesmo ocorreu com o extrato etanólico.

1.3.1.1.5 Atividade antioxidante do hibisco - Polifenóis totais e antocianinas

Os polifenóis têm despertado um interesse nos consumidores e nas indústrias alimentícias por diversas razões. Estudos epidemiológicos têm sugerido uma associação entre o consumo de alimentos e bebidas ricas em polifenóis e a prevenção de doenças (STEINMETZ & POTTER 1996). Os polifenóis são agentes redutores que tem a capacidade de oferecer proteção contra o estresse oxidativo, portanto podem ser classificados como antioxidantes (ENGLE & ENGLER, 2004).

A cor é um atributo fundamental para o julgamento de um alimento, a apreciação visual é o primeiro dos sentidos a ser usado, sendo esta uma característica decisiva na escolha e aceitação do produto (LIMA et al., 2007). As antocianinas são pigmentos responsáveis pela coloração (azul, violeta e tonalidades de vermelho) de muitos alimentos (TSAI & Ou, 1996; MUÑOZ-ESPADA et al., 2004), e estão presentes no reino vegetal, em flores e frutas (MAZZA et al., 1993). As antocianinas são uma característica das angiospermas (BRIDLE & TIMBERLAKE, 1997; MAZZA et al., 1993)

Os cálices do hibisco contêm uma alta concentração de antocianinas e uma boa fonte de antioxidante (SAYAGO-AYERDI et al., 2007; TSAI et al., 2002; BRIDLE & TIMBERLAKE, 1997; JULIANI et al., 2009). O hibisco é uma fonte de fitoesteróis e polifenóis (ALI-BRADELDIN et al., 2005). As duas principais antocianinas do hibisco são a delphinidina 3-sambubiosídeo (85% de antocianina) e a cianidina 3-sambubiosídeo (TSAI et al., 2002; JULIANI et al., 2009).

Existe um aumento na evidência que os antioxidantes na dieta humana são os principais responsáveis pelos benefícios para a saúde e o bem estar (TSAI et al.,

2002). As antocianinas possuem atividade antioxidante, anticancerígena, proteção contra a aterosclerose, inibem a agregação plaquetária, melhoram a função visual, possuem propriedades vaso protetoras e poderiam exercer efeitos neurológicos benéficos (IGARASHI et al., 1989; TAMURA & YAMAGAMI, 1994; TALAVERA et al., 2004).

1.3.2 Microrganismos

1.3.2.1 *Escherichia coli*

Em 1885, o médico austríaco Escherich tentou isolar o agente etiológico da cólera, no entanto isolou e estudou um microrganismo atualmente chamado de *Escherichia coli*. Scharinger foi o primeiro a sugerir o uso desta bactéria como um indicador da poluição fecal. T. Schmith em 1985 sugeriu o teste para mensurar a potabilidade de água, marcando o início do uso dos coliformes como indicadores de patógenos em água, prática estendida aos alimentos (JAY et al., 1995).

A indústria de alimentos, no século XX, considerou a *E. coli* como um microrganismo indicador da qualidade higiênico-sanitária, no entanto nas últimas décadas, se comprovou que diversos sorotipos desta bactéria eram altamente patogênicos ao homem e podiam causar diversas infecções (GERMANO & GERMANO, 2008).

Muitos tipos de *E. coli* causam diarreia, infecções no trato urinário, doenças respiratórias, pneumonia e outras enfermidades (CDC, 2008). Dependendo do tipo de infecção (enteropatogênica, enterotoxigênica, enterohemorrágica, enteroinvasivas) varia o período de incubação da doença (GERMANO & GERMANO, 2003).

A *E.coli* é um membro da família Enterobacteriaceae, é gram-negativa, catalase-positiva e oxidase-negativa. Mesófila, capaz de se desenvolver entre 7° e 46°C, sendo 37°C a temperatura ótima, embora existam cepas que possam se multiplicar a 4°C. Pode ser destruída a 60°C e é capaz de resistir por muito tempo em temperaturas de refrigeração. Encontrada, normalmente, nos intestinos dos animais e do homem. Representa cerca de 80% da flora intestinal aeróbia, sendo eliminada pelas fezes o que ocasiona a contaminação nos solos e nas águas (GERMANO & GERMANO, 2003).

1.3.2.2 *Enterococcus*

São cocos gram-positivos, imóveis, catalase-negativos. Ocorrem em pares ou em cadeias. A maioria são anaeróbios facultativos, mas crescem fermentativamente mesmo em presença de oxigênio. As espécies mais importantes são o *Enterococcus faecalis* e o *Enterococcus faecium*. Não são muito virulentos, mas se destacam nas infecções hospitalares devido a sua resistência a múltiplos antibióticos. Fazem parte da flora normal fecal, podendo colonizar as membranas mucosas orais e a pele especialmente em hospitais. Podem ser encontrados em fômites, pois são muito resistentes a agentes ambientais e químicos. Raramente causam doenças em indivíduos saudáveis, porém causam doenças se a resistência do hospedeiro está diminuída ou em que a integridade do trato gastrointestinal ou geniturinário foi rompida. Por exemplo, pela instrumentação, os enterococos podem se disseminar em locais normalmente estéreis, causando infecções urinárias, bacteremia/sepsis, endocardite bacteriana subaguda, infecção do trato biliar ou abscessos intra-abdominais (STROHL et al., 2004).

Os *Enterococcus* são utilizados como indicadores da contaminação fecal, reportados em surtos de doença alimentar, sendo responsáveis por estragar carnes processadas. Podem desempenhar aspectos benéficos como o amadurecimento e aroma de certos queijos e embutidos, pode ser utilizado como próbiótico e no tratamento de gastroenterites em humanos e animais (FRANZ et al. 2003; FRANZ et al. 1999).

O principal reservatório dos *Enterococcus* são os humanos que podem contaminar úberes de animais através da ordenha ou por contaminações no próprio leite. Os locais de maior incidência de surtos são os países de terceiro mundo, onde o consumo de leite em natura é mais pronunciado (ACHA & SZYFRES, 2003).

1.3.2.3 *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* possui mais de 30 espécies. São bactérias gram-positivas. Embora mesófilas, *Staphylococcus aureus* pode crescer a temperaturas de até 6,7°C até 47,8°C e as enterotoxinas são produzidas entre 10°C e 46°C. As espécies de estafilococos são hospedeiro-adaptadas, e a metade das espécies conhecidas habita somente os humanos e outros animais. Um maior número tende a ser encontrado próximo das aberturas do corpo e superfícies da pele como narinas, axilas e na virilha. Em locais úmidos, o número por cm² pode alcançar 10³ a 10⁶ e

em habitats secos, 10 a 10³. As fontes mais importantes de contaminação para os alimentos são fossas nasais, mãos e braços de manipuladores de alimentos com furúnculos. A maioria dos animais domésticos abriga *S.aureus*. A ocorrência de mastite estafilocócica é bem conhecida nos rebanhos leiteiros. Os sintomas da doença, que aparecem cerca de 4 horas após a ingestão de alimentos contaminados, são: náuseas, câimbras abdominais geralmente agudas, diarreia, dor de cabeça, sudorese, prostração e queda da temperatura corporal. Os sintomas duram de 24 a 48 horas (JAY, 2005).

1.3.2.4 *Salmonella*

A *Salmonella* é um gênero pertencente a família Enterobacteriaceae. Gram negativas, não formam esporos, anaeróbias facultativas e tem a forma de bastonetes curtos. A maioria das *Salmonellas* são imóveis com flagelos petríquos. A *Salmonella* fermenta a glicose formando ácido e gás, porém não metaboliza a lactose e a sacarose. A temperatura ótima de crescimento mínima é de 5°C e a temperatura máxima de crescimento é de 38°C. Como não formam esporos são termossensíveis, morrendo a 60°C por 15 a 20 minutos. Este gênero possui cerca de 2.324 linhagens (ou sorovares) diferentes. Os sintomas da doença (que surgem após 16 a 72 horas de ingestão) são diarreia, náusea, dor abdominal, febre branda e calafrios, algumas vezes vômitos, dor de cabeça e fraqueza. A doença persiste de 2 a 7 dias. A *Salmonella* Enteritidis pode contaminar ovos e as suas gemas por meio de infecção transovariana. A *Salmonella* Enteritidis é a causa predominante de salmonelose em diversos países (FORSYTHE, 2002).

A salmonelose é uma das principais zoonoses universais sendo considerada um grave problema de saúde pública. O aparecimento de novos sorovares de *Salmonella* é devido ao uso indiscriminado de antibióticos (VELGE et al., 2005).

Os reservatórios de *Salmonella* zoonótica são os animais e os alimentos de origem animal (ACHA & SZYFRES, 2003).

CAPÍTULO 2

**ARTIGO: Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.)
como fator de proteção antibacteriana e antioxidante em alimentos**

Artigo que será enviado à Revista Brasileira de Plantas Mediciniais – RBPM
Revista Brasileira de Plantas Mediciniais
Herbário – Instituto de Biociências
Caixa Postal 510 UNESP – Campus de Botucatu
18618-000 – Botucatu – SP

Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante em alimentos

MACIEL, M.J.¹; PAIM, M.P.²; CARVALHO, H.H.C.¹; WIEST, J.M.^{1*}

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil. * Correspondência: J.M.Wiest – ICTA/UFRGS, Campus do Vale, Avenida Bento Gonçalves, 9500, Caixa Postal 15090, CEP 91505-970, Porto Alegre – RS/Brasil. E-mail: jmwiest@ufrgs.br

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

RESUMO

O hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) além de possuir propriedades antioxidantes e antimicrobianas, é utilizado como planta medicinal e alimento funcional nos países tropicais. Através de Testes de Diluição em Sistema de Tubos Múltiplos determinou-se a Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB/Bacteriostasia) e a Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana (IINAB/Bactericidia) de extrato alcoólico de dois acessos de hibisco, a saber: Palmares do Sul/RS e Porto Alegre/RS sobre inóculos padronizados de *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Paralelamente, o teor de polifenóis totais e de antocianinas nos cálices e nos frutos com sementes do hibisco foi determinado. A atividade antimicrobiana do extrato alcoólico de cálices, em ambos os acessos, apresentou diferença positiva significativa quando relacionada ao extrato alcoólico dos frutos com as sementes. *Salmonella* Enteritidis foi a bactéria mais sensível ao

extrato alcoólico de cálices do hibisco enquanto a mais resistente foi *Staphylococcus aureus*, independente da variável acesso, considerando somente a estrutura vegetal. Em relação ao extrato alcoólico dos frutos com sementes, *Escherichia coli* demonstrou a maior sensibilidade e *Staphylococcus aureus* a maior resistência. Os valores de polifenóis totais e de antocianinas do extrato alcoólico de cálices apresentaram diferença significativa entre si e foram superiores ao extrato alcoólico dos frutos com sementes. Possivelmente existe uma relação direta entre a concentração de antocianina e a atividade antibacteriana em diferentes estruturas vegetais do hibisco.

Palavras- chave: *Hibiscus sabdariffa* L., inibição bacteriana, inativação bacteriana, polifenóis totais, antocianinas.

ABSTRACT Evaluation of the alcoholic extract of hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) as a protective antibacterial and antioxidant in food. The hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) has antioxidant and antimicrobial properties and is utilized as functional food and medicinal plant in tropical countries. Through of Dilution Testing in Multiple Tubes System, it were determined the intensity of bacterial inhibition activity (IINIB/ Bacteriostasy) and the intensity of bacterial inactivation activity (IINAB/ Bactericidie) of alcoholic extracts of two accesses of hibiscus, known as: Palmares do Sul/RS and Porto Alegre/RS on standardized inoculum of *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Escherichia coli* (ATCC 11229), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 11076) and *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). At the same time, the total content of polyphenols and anthocyanins in the calyxes and fruits with seeds hibiscus was determined. The antimicrobial activity of alcoholic extract of the calyxes in both

accesses showed a significant positive difference when related to the alcoholic extract of the fruits with seeds. *Salmonella enteritidis* was the most sensitive bacteria to the alcoholic extract of calyxes of the hibiscus while the most resistant was *Staphylococcus aureus*, independent of the variable access, considering only the plant structure. In relation to the alcoholic extract of the fruits with seeds, *Escherichia coli* showed the highest sensitivity and *Staphylococcus aureus* the highest resistance. Total polyphenols and anthocyanins of alcoholic extract of calyxes's values showed a significant difference and they were superior to alcohol extract of fruits with seeds. Possibly there is a direct relationship between the concentration of anthocyanin and antibacterial activity in different structures of the hibiscus plant.

Key words: *Hibiscus sabdariffa* L., bacterial inhibition, bacterial inactivation, total polyphenols, anthocyanins.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos tem havido uma intensa preocupação pela disponibilidade de uma alimentação de qualidade e natural (Gould, 1995), os alimentos que contém altos níveis de conservantes para redução da carga microbiana são indesejáveis. A pressão por parte dos consumidores se volta para uma produção maior de alimentos frescos, com conservantes naturais e uma maior garantia de segurança (Forsythe, 2002).

Existe um grande interesse em substituir os conservantes artificiais por conservantes naturais nos alimentos. As substâncias naturais, de origem vegetal tornam o alimento mais atrativo ao consumidor (Pereira et al., 2006), além de aumentar a sua vida útil pela capacidade bacteriostática e bactericida, retardando o

começo da deterioração e o crescimento de microrganismos indesejáveis (Souza, 2003). O uso inadequado de antibióticos sintéticos faz com que microrganismos patogênicos apresentem resistência a medicamentos, havendo a necessidade de novos antimicrobianos de fontes naturais (Sartoratto et al., 2004). O mesmo ocorre com os antioxidantes sintéticos, restritos tanto pela sua aplicação quanto pela sua quantidade (Peng et al., 2005).

Conhecido popularmente como vinagreira, rosela, caruru-azedo, azedinha, caruru-da-guiné, azeda-da-guiné, quiabo-azedo, quiabo-róseo, quiabo-roxo, rosela, rosélia, groselha, quiabo-de-angola, groselheira (Lorenzi E Matos, 2002), o hibisco é uma espécie vegetal da família *Malvaceae* proveniente da África Oriental (Martins et al., 1994) e foi introduzido ao Brasil pelos escravos (Panizza, 1997).

Arbusto de ciclo anual, o hibisco pode atingir mais de 1,80m de altura, é pouco ramificado e com a forma de taça de tonalidade vermelha (McCaleb, 1998). Cultivado em regiões tropicais e subtropicais (Martins, 1985). A flor é simples, séssil e axilar. Sua corola é composta por cinco sépalas de intensa coloração vermelha em forma de cone que forma o cálice. Na base do cálice está o calículo ou o pequeno cálice disposto em círculo (Castro et al., 2004). A cápsula deiscente é o fruto que possui um aspecto aveludado e cerca de 2 cm de comprimento, abrigando as sementes (Mahadevan et al., 2009; Duke, 1978). O termo “cálice” neste trabalho envolve o cálice propriamente dito e o pequeno cálice ou calículo. O termo “fruto com semente” envolve a cápsula deiscente e as sementes.

O hibisco é um alimento funcional nos países da Ásia (Japão, China, Coréia e Taiwan) (Liu et al., 2005). O interesse econômico está nos cálices desidratados, utilizados mundialmente para a produção de bebidas, alimentos (D' Heurex- Calix & Badrie, 2004), conservantes (Liu et al., 2005) e antioxidantes (Wang et al., 2000). As

sementes do fruto do hibisco surgem como um subproduto concomitante ao cultivo em larga escala e a exploração comercial da planta (Vilche et al., 2003). Estas estruturas vegetais podem ser uma fonte de antioxidantes. Ao serem trituradas, servem na alimentação humana como uma fonte expressiva de proteína e se torradas, são substitutas do café (Morton, 1987).

Alguns autores, como Chao & Yin (2009), relatam uma possível relação entre a quantidade de antocianinas e a atividade antimicrobiana do hibisco.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB) e de Inativação Bacteriana (IINAB) *in vitro* do extrato alcoólico obtido de cálices e frutos com sementes de dois diferentes acessos de *Hibisco sabdariffa* L. (hibisco) frente a agentes bacterianos padrões internacionais de interesse em alimentos, relacionando estes resultados à presença de polifenóis totais e antocianinas.

MATERIAL E MÉTODO

O experimento foi desenvolvido no Laboratório de Higiene do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre/RS.

Os ramos do hibisco (*Hibisco sabdariffa* L.) *in natura* foram coletados em Palmares do Sul/RS, Bacupari (coordenadas 30° 16' S e 50° 28 'O) e Porto Alegre/RS, Lami (coordenadas 30° 14' S e 51° 06' O). As amostras foram identificadas botanicamente e encaminhadas como exsiccatas (Ming, 1996) para registro no Herbário do Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/RS/Brasil, recebendo números de

registro ICN 165038 (acesso Palmares do Sul/RS) e ICN165039 (acesso Porto Alegre/RS).

Foram separados manualmente os cálices e os calículos, restando os frutos com as sementes do hibisco.

Os cálices e os frutos com sementes frescos do hibisco foram submetidos, separadamente, ao processo de extração alcoólica (alcoholatura dos componentes *in natura*), para a obtenção das soluções conservantes ou antibacterianas, segundo Farmacopéia (1959) e Lorenzi & Matos (2002), Avancini (2002), Souza & Wiest (2007) e Avancini & Wiest (2008).

Os componentes vegetais do hibisco foram colocados, separadamente, em álcool etílico, de cereais (Farmaquímica®, Porto Alegre/RS/BR) a 96 °GL, na proporção de 400 g de cálices/frutos com sementes para 1000 mL de álcool, na extração alcoólica. Após um período de quinze dias, foram submetidos à destilação fracionada sob pressão reduzida em sistema rota vapor, desprezou-se a porção alcoólica e reidratou-se o extrato resultante com água destilada estéril, reconstituindo-se as concentrações iniciais dos componentes. Para o controle permanente da assepsia dos procedimentos de extração e reconstituição, determinou-se a esterilidade de todos os extratos, retirando-se alíquotas de 5 mL, semeadas em tubos contendo 5 mL de Caldo-Cérebro-Coração (BHI, HIMEDIA®, Mumbai/Índia), incubados aerobicamente à 37 °C por até 48 horas, confirmando-se sua esterilidade, por plaqueamento em Agar Nutriente (Nutrient Agar, ACUMEDIA®, Maryland/Baltimore/USA).

Foram desafiadas quatro amostras bacterianas padronizadas (American Type Culture Collection- ATCC), duas gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (25923) e *Enterococcus faecalis* (19433) e duas gram-negativas: *Escherichia coli* (11229), e

Salmonella Enteritidis (11076). Estas bactérias pertenciam ao Laboratório de Higiene do ICTA/UFRGS, sendo ativadas especificamente para este estudo em meio de cultura BHI à 37 °C por um período de 18 a 24 horas de incubação aeróbica, com o objetivo de atingir uma concentração $\geq 1,0 \times 10^8$ UFC/mL para confrontação com os extratos alcoólicos de cálices e frutos com sementes de hibisco, através de diluições seriais logarítmicas (Avancini, 2002). A avaliação da concentração inicial foi realizada através da técnica da microgota segundo Romeiro (2007) e a contagem de microrganismos viáveis foi realizada em placas de Petri contendo meio de cultura BHI (Brain Heart Infusion - DIFCO®). Foram realizadas diluições seriadas, a partir do inóculo inicial, transferindo-se 1 mL deste para tubos de ensaio contendo 9 mL de água peptonada 0,1% (BIOBRÁS®, Montes Claros/MG/BR) para obter a diluição 10^{-1} , e assim sucessivamente até a diluição 10^{-12} . De cada diluição foram transferidas três gotas para placas de Petri utilizando micropipetas de 15 μ L e a leitura foi realizada em intervalos de 24, 48, 72 e 144 horas de incubação aeróbia à 37 °C. O valor final considerado foi constituído da média das contagens das gotas triplicadas, avaliadas biometricamente segundo Cavalli-Sforza (1974).

Para a determinação da atividade antibacteriana dos extratos de hibisco lida como Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana/Bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/Bactericidia (IINAB), utilizou-se o Teste de Diluição segundo Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft/ Sociedade Alemã de Medicina Veterinária (DVG, 1981) com base na técnica do sistema de tubos múltiplos, modificada por Avancini (2002), retomada por Souza & Wiest (2007) e Avancini & Wiest (2008), Wiest et al., (2009 a, b, c), confrontando-se os diferentes extratos com 12 diluições seriais logarítmicas (10^{-1} a 10^{-12} UFC/mL) dos diferentes inóculos bacterianos.

Entende-se por IINIB/ Bacteriostasia o resultado do confronto da bactéria com a solução antibacteriana em meio específico, o BHI, e por IINAB/ Bactericidia, o resultado deste confronto porém sob a influência de desestressores/ desinibidores bacterianos como Tween 80 (REAÇÃO QUÍMICA®, Porto Alegre/ RS/BR), L-histidina (LABSYBTH®, Diadema, SP/BR) e lecitina de soja (HERBARIUM®, Colombo, PR/BR), acrescidos ao mesmo BHI (DVG, 1981; Avancini, 2002; Souza & Wiest, 2007; Avancini & Wiest, 2008; Wiest et al., 2009 a, b, c). Os resultados são expressos em valores que são representações da atividade biológica inibitória/bacteriostasia ou inativadora/bactericidia de diferentes soluções antibacterianas sobre diferentes microrganismos, em testes de sensibilidade.

Os resultados de IINIB e de IINAB foram representados por variáveis ordinais arbitrárias, que assumiram valores de 12 a 0, sendo que o valor de 12 (doze) representa atividade máxima e 0 (zero) a não-atividade, como demonstra a Tabela 1 a seguir.

TABELA 1- Representação dos valores ordinais arbitrários de intensidade de atividade atribuídos às variáveis Intensidade da Atividade de Inibição Bacteriana/bacteriostasia (IINIB) e Intensidade de Atividade de Inativação Bacteriana/bactericidia (IINAB) e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos.

| 12 | 11 | 10 | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 | 0 | Variáveis ordinárias de intensidade de atividade |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|------------|------------|------------|-----|--|
| 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} | 10^{-7} | 10^{-8} | 10^{-9} | 10^{-10} | 10^{-11} | 10^{-12} | n.a | UFC/mL – diluições de inóculo inibidas ou inativadas |
| 10^8 | 10^7 | 10^6 | 10^5 | 10^4 | 10^3 | 10^2 | 10^1 | 10 | 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-3} | n.a | UFC/mL – doses infectantes inibidas ou inativadas |

n.a: ausência de atividade antibacteriana;

UFC/mL: unidades formadoras de colônias por mL.

A avaliação dos resultados obtidos das variáveis de IINIB e de IINAB para os extratos alcoólicos das diferentes estruturas do hibisco confrontadas *in vitro* com os

agentes bacterianos, foi verificada através da análise de variância (ANOVA), com complementação pelo teste de Tukey, segundo Callegari-Jacques (2004).

A extração de polifenóis totais foi realizada segundo a metodologia de Vinson et al. (2001) com modificações. Amostras de 100 μL do extrato (cálices e frutos com sementes) foram colocadas em tubos de rosca do tipo *ependorf*, sendo posteriormente acrescidos de 500 μL de solução de extração contendo metanol (Grupo Químico®/BR) a 50% e ácido clorídrico (Nuclear®/BR) a 1,2M. Os tubos foram colocados em banho-maria a 90° C por três horas. Posteriormente, foram retirados do banho e, depois de resfriados em temperatura ambiente, o volume foi completado a 1 mL com metanol puro (Grupo Químico®/BR). Em seguida, as amostras foram centrifugadas (Centrifuge 5415R- Eppendorf®, Germany) a 5.000 rpm por cinco minutos e os sobrenadantes foram obtidos com auxílio de uma pipeta automática, sendo estes denominados extratos de polifenóis totais. As extrações foram realizadas em duplicata (Faller & Fialho, 2009).

A determinação de polifenóis totais foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (Proton Química®/RS) segundo Karou et al. (2005). A solução de Folin foi preparada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e água deionizada 1:1 (v/v). Em tubo do tipo *ependorf* foram adicionados 30 μL do extrato de polifenol, acrescidos de 75 μL da solução de Folin- Ciocalteu. Após cinco minutos de reação foram adicionados 75 μL de solução de carbonato de sódio (Synth®/BR) (20%) e o volume foi completado com água deionizada até 600 μL . A solução reagiu por 30 minutos e posteriormente foi realizada a leitura em espectrofotômetro (UV Mini 1240, Shimadzu®, Japan) a 750nm utilizando ácido gálico (Merck®/BR) como padrão. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g

de extrato. A determinação de polifenóis totais foi realizada em quatro experimentos independentes, cada um em duplicata (Faller & Fialho, 2009).

O conteúdo de antocianinas totais foi determinado pelo método da diferença de pH (Giusti & Wrosltad, 2001) em que se dissolve dois sistemas tampão: cloreto de potássio (Merck®/BR) pH 1 (0,025M) e acetato de sódio (Synth®/BR) pH 4,5 (0,4M). Foram adicionados 1,8 ml da correspondente solução tampão a 0,2 ml da amostra diluída para se obter a densidade óptica na faixa de 540 e 700nm (Kuskoski et al. 2006, com modificação).

Utilizou-se a equação abaixo para determinar a absorbância:

$$A = (A_{\text{máx.vis.}(540\text{nm})} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH1}} - (A_{\text{máx.vis.}(540\text{nm})} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH4,5}}$$

O cálculo das antocianinas foi baseado em Teixeira et al. (2008), modificado para:

$$\text{AntT (mg/100g)}: \frac{D.O. \times F.D. \times 1000 \times P.M.}{Fex \times m}$$

Onde *D.O.* é a densidade ótica do extrato, *F.D.* é o fator de diluição, *P.M.* é o peso molecular, o *Fex* é o fator de extinção e o *m* é a massa de amostra.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

O hibisco dentre os seus inúmeros benefícios, pode ser utilizado em sistemas alimentares para prevenir a contaminação bacteriana. A análise da sensibilidade das bactérias testadas frente a solução antimicrobiana alcoólica de cálices e frutos com sementes de hibisco, obtida de dois diferentes acessos, independentemente do tempo de confrontação, presença ou ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos, apresentou diferença significativa entre as bactérias confrontadas, como pode ser visto na Tabela 2. A atividade antibacteriana do extrato alcoólico de cálices do hibisco, em ambos os acessos, apresentou diferença significativa quando

relacionado ao extrato alcoólico dos frutos com sementes, ou seja, o extrato alcoólico dos cálices tem um poder antibacteriano maior do que o extrato alcoólico dos frutos com sementes do hibisco. Fato que, possivelmente, pode estar relacionado a uma maior quantidade de antocianinas no extrato alcoólico de cálices, se comparado ao extrato alcoólico de frutos com sementes. A mesma hipótese foi constatada por Chao & Yin (2009), utilizando o extrato alcoólico e aquoso de cálices de hibisco e ácido protocatecuico contra bactérias de interesse alimentar, constataram uma possível relação entre os compostos fenólicos e o efeito antibacteriano dos extratos de cálices de hibisco.

Independente do acesso, somente considerando a estrutura vegetal, *Salmonella* Enteritidis (11,5) foi a bactéria mais sensível ao extrato alcoólico de cálices de hibisco e *Staphylococcus aureus* (5,2) a mais resistente. Esta observação confirma os resultados encontrados por Carvalho et al. (2005), ao estudar a atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar. A bactéria *Salmonella* Enteritidis também demonstrou, predominantemente, a maior sensibilidade aos diferentes extratos, nas condições experimentais de Carvalho et al. (2005). No estudo vigente, em relação ao extrato alcoólico das cápsulas deiscantes, *Escherichia coli* (12) foi a bactéria mais sensível e *Staphylococcus aureus* (0,1) a mais resistente.

TABELA 2- Análise da sensibilidade de quatro espécies bacterianas de interesse em alimentos frente à soluções conservantes de dois acessos de cálices e de frutos com sementes de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), independente dos fatores de tempo de confrontação, presença ou ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos.

| Acesso Palmares do Sul/RS | | | |
|--|---------------------------------|--|---------|
| Espécies bacterianas | Valores Arbitrários* Cálices | Valores Arbitrários* Frutos com sementes | p value |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433) | 10,4 ^b | 3,3 ^a | 0,007 |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229) | 10 ^b | 12 ^b | 0,007 |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 11076) | 11,5 ^a | 4,7 ^c | p<0,05 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | 7,8 ^c | 9,7 ^d | p<0,05 |
| Acesso Porto Alegre/RS | | | |
| Espécies bacterianas | Valores Arbitrários* Cálices | Valores Arbitrários* Frutos com sementes | p value |
| <i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433) | 8,3 ^b | 0,3 ^a | 0,001 |
| <i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229) | 7,7 ^c | 0,4 ^a | 0,001 |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 11076) | 11,5 ^a | 2,1 ^b | 0,0001 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) | 5,2 ^d | 0,1 ^c | p<0,05 |

*12 a 1= valores arbitrários que representam a intensidade da atividade antibacteriana (média de 2 repetições)

0= não atividade

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna por acesso indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (p<0,05).

p-value < 0,05 indica diferença significativa entre os valores localizados na mesma linha, sépalas e cápsulas deiscantes, de cada um dos microrganismos pela Análise de Variância (ANOVA).

Analisando a atividade antimicrobiana dos dois diferentes acessos e das duas diferentes estruturas vegetais, como pode ser visto na Tabela 2, que em relação ao acesso Palmares do Sul/RS a bactéria mais sensível ao extrato alcoólico de cálices foi *Salmonella* Enteritidis (11,5) e a mais resistente, *Staphylococcus aureus* (7,8). O extrato alcoólico de frutos com sementes, com o maior valor arbitrário quanto a sensibilidade bacteriana, foi o da bactéria *Escherichia coli* (12), e o menor valor arbitrário, sendo considerada a bactéria mais resistente, *Enterococcus faecalis* (3,3). Sob a ação do extrato de hibisco, acesso Porto Alegre/RS, os resultados apresentaram a bactéria mais sensível como sendo *Salmonella* Enteritidis (11,5 e 2,1) e a mais resistente, *Staphylococcus aureus* (5,2 e 0,1), nos extratos alcoólicos de cálices e frutos com sementes, respectivamente (Tabela 2). Diferentes acessos podem apresentar atividade antibacteriana distinta, provavelmente relacionadas ao

solo, clima, disponibilidade de fitonutrientes e diferentes varietais, influenciando os teores do composto relacionado à atividade antimicrobiana.

Os tratamentos IINIB e IINAB do extrato alcoólico de cálices de hibisco em relação à espécie bacteriana confrontada, independentemente do fator tempo de confrontação, apresentaram diferenças significativas (Tabela 3). O tratamento IINIB apresentou resultado superior ao IINAB para todas as espécies bacterianas com exceção da bactéria *Escherichia coli* (10) do acesso Palmares do Sul/RS, que apresentou o mesmo valor para IINIB e para IINAB. A ação do extrato alcoólico de cálices de hibisco tem ação bacteriostática superior, quase que total, à ação bactericida. Com a mesma metodologia, mas com plantas diferentes, Souza & Wiest (2007), Girolometto et al. (2009) e Carvalho et al. (2005) encontraram resultados superiores para IINIB em relação ao IINAB.

TABELA 3- Análise da presença e da ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extrato alcoólico de cálices de dois acessos de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), independente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas.

| Espécie bacteriana | Palmares do Sul/RS | | | Porto Alegre/RS | | |
|-------------------------------|--------------------|------------------|---------|-------------------|-------------------|---------|
| | IINIB* | IINAB* | p-value | IINIB* | IINAB* | p-value |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 11,6 ^b | 9,1 ^b | 0,007 | 9,3 ^b | 7,3 ^b | 0,002 |
| <i>Escherichia coli</i> | 10 ^a | 10 ^a | 0,5 | 8,5 ^a | 6,9 ^c | 0,003 |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis | 12 ^c | 11 ^c | 0,02 | 11,8 ^c | 11,3 ^a | 0,35 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 11 ^b | 4,5 ^b | p<0,05 | 9,4 ^b | 1 ^d | 0,001 |

*12 a 1= valores arbitrários que representam a intensidade da atividade antibacteriana (média de 2 repetições)

0= não atividade

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (p<0,05).

p-value < 0,05 indica diferença significativa entre os valores de IINIB e IINAB pela Análise de Variância (ANOVA), considerando espécies bacterianas e acessos.

Os maiores valores arbitrários de IINIB e IINAB tanto para o acesso Palmares do Sul/RS quanto para o acesso Porto Alegre/RS foram os valores da bactéria *Salmonella* Enteritidis (12 e 11,8; 11 e 11,3 respectivamente) (Tabela 3). Os menores valores de IINIB, para ambos os acessos, foi de *Escherichia coli* (10 e 8,5). E em relação à IINAB, em ambos os acessos, Palmares do Sul/RS e Porto

Alegre/RS apresentaram os menores valores frente a *Staphylococcus aureus* (4,5 e 1).

Olaleye, em 2007, testou o extrato alcoólico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. como um agente antibacteriano frente aos microrganismos: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marcescens*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescens*. O extrato obteve uma excelente atividade antibacteriana frente aos microrganismos testados. A atividade antibacteriana do hibisco pode ser comparada à da Estreptomicina, no entanto a Estreptomicina não inibe *E. coli*. No estudo em evidência, a pesquisa de Olaleye se confirma parcialmente, pois o extrato alcoólico de cálices do hibisco sem os desinibidores apresentou valores arbitrários maiores tanto para *Staphylococcus aureus* (11 e 9,4) quanto para *Escherichia coli* (10 e 8,5), nos acessos Palmares do Sul/RS e Porto Alegre/RS, respectivamente (Tabela 3).

O extrato alcoólico de cálices do hibisco, no estudo em evidência, sem os desinibidores, apresentou valores arbitrários maiores tanto para *Staphylococcus aureus* (11 e 9,4) quanto para *Escherichia coli* (10 e 8,5), para os acessos Palmares do Sul/RS e Porto Alegre/RS, respectivamente (Tabela 3).

TABELA 4- Análise da presença e da ausência de desestressores/desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extrato alcoólico de frutos com sementes de dois acessos de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), independente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas.

| Espécie bacteriana | Palmares do Sul/RS | | | Porto Alegre/RS | | |
|-------------------------------|--------------------|------------------|---------|-------------------|--------------------|---------|
| | IINIB* | IINAB* | p-value | IINIB* | IINAB* | p-value |
| <i>Enterococcus faecalis</i> | 6,5 ^b | 0 ^a | p<0,05 | 0,3 ^{ad} | 0,3 ^{ad} | 0,6 |
| <i>Escherichia coli</i> | 12 ^a | 12 ^b | 0,4 | 0,3 ^{bd} | 0,50 ^{bd} | 0,001 |
| <i>Salmonella Enteritidis</i> | 5,4 ^c | 4 ^c | 0,06 | 1,8 ^c | 2,5 ^c | 0,02 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 11,5 ^d | 7,8 ^d | p<0,05 | 0,3 ^{ab} | 0 ^{ab} | 0,3 |

*12 a 1= valores arbitrários que representam a intensidade da atividade antibacteriana (média de 2 repetições)

0= não atividade

Letras minúsculas diferentes sobrescritas (^a) na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (p<0,05).

p-value < 0,05 indica diferença significativa entre os valores de IINIB e IINAB pela Análise de Variância (ANOVA), considerando espécies bacterianas e acessos.

Na Tabela 4 pode ser vista a presença e a ausência de desinibidores/desestressores bacterianos na atividade antibacteriana de extrato alcoólico de frutos com sementes dos dois acessos de hibisco, independente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas.

Predominantemente os valores de IINIB foram maiores se relacionados aos valores de IINAB. No entanto no acesso Palmares do Sul/RS o valor de IINIB e IINAB de *Escherichia coli* foi igual (12), o mesmo ocorreu no acesso Porto Alegre/RS com o valor de *Enterococcus faecalis* (0,3). *Escherichia coli* (0,3 e 0,5) e *Salmonella* Enteritidis (1,8 e 2,5) no acesso Porto Alegre/RS tiveram valores de IINIB menores que IINAB, ou seja, o extrato alcoólico dos frutos com sementes, nesses casos, teve uma atividade bactericida maior do que bacteriostática.

Os valores arbitrários de IINIB e IINAB do acesso Palmares do Sul/RS mostraram-se maiores aos do acesso Porto Alegre/RS, fato que possivelmente pode ser atribuído as diferenças locais de clima, de solo, disponibilidade de fitonutrientes e varietal, influenciando a quantidade da substância responsável pela atividade antibacteriana. Os maiores valores de IINIB e IINAB para o acesso Palmares do Sul/RS foram da espécie bacteriana *Escherichia coli* (12) e para o acesso Porto Alegre/RS *Salmonella* Enteritidis (1,8 e 2,5). Os valores de IINAB de *Enterococcus faecalis* (acesso Palmares do Sul/RS) e *Staphylococcus aureus* (Porto Alegre/RS) foram zero, refletindo que somente houve bacteriostasia e não bactericidia (Tabela 4).

TABELA 5- Análise da relação entre as diferentes estruturas de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), a atividade antibacteriana, a quantidade de polifenóis e antocianinas, independente dos fatores tempo de confrontação, acesso e espécie bacteriana de interesse alimentar e da presença ou da ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extrato alcoólico de hibisco.

| Estrutura vegetal | Polifenóis totais (mg GAE/100g) | Antocianinas (mg/100g) | <i>p-value</i> | Atividade Antibacteriana* |
|---------------------|---------------------------------|------------------------|----------------|---------------------------|
| Cálices | 162,1 | 85,9 | <i>p</i> <0,05 | 9,1 |
| Frutos com sementes | 114,9 | 3,2 | <i>p</i> <0,05 | 4,1 |

*12 a 1= valores arbitrários que representam a intensidade da atividade antibacteriana

(média de 4 repetições)

0= não atividade

A quantidade de polifenóis totais e antocianinas do extrato alcoólico de cálices (162,1) e do extrato alcoólico dos frutos com sementes (114,9) apresentam diferença significativa. O extrato alcoólico de cálices (85,9) apresenta uma maior quantidade de antocianinas do que o extrato alcoólico de frutos com sementes (3,2), como pode ser observado na Tabela 5.

Um estudo realizado por Juliani et al. (2009) avaliou a atividade antioxidante, os fenóis totais e o conteúdo de antocianina com extrato metanólico de cálices de diferentes colorações de *Hibiscus sabdariffa* L. e constatou que a relação entre a cor dos cálices e a quantidade de antocianina não está sempre em conformidade. No presente estudo, foram comparadas diferentes estruturas vegetais, cálices e frutos com sementes, e constatou-se exatamente o contrário, os frutos com sementes, de coloração verde apresentaram uma menor quantidade de polifenóis totais e de antocianinas quando comparados aos cálices vermelhos.

O extrato alcoólico de cálices do hibisco apresentou uma alta concentração de antocianinas e de polifenóis totais, indo ao encontro do que foi citado por Sáyago-Ayerdi et al. (2007); TSAI et al. (2002); LAI et al. (1991) quando relacionaram a alta concentração de antocianinas nos cálices do hibisco com uma boa fonte de antioxidante, devido aos seus compostos fenólicos.

Analisando a Tabela 5, a atividade antimicrobiana do extrato alcoólico de cálices (9,1) é maior do que a do extrato alcoólico dos frutos com sementes (4,1), permitindo concluir que possivelmente, as antocianinas, nas condições deste experimento, seriam as responsáveis por esta atividade. Estes resultados confirmam a hipótese inicial de que a relação entre o teor de antocianinas é diretamente proporcional à atividade antibacteriana.

As extrações dos compostos antimicrobianos e antioxidantes (antocianinas e polifenóis totais) nas diferentes estruturas do hibisco, neste trabalho, foram realizadas através de alcoolatura etanólica, ao invés de extração aquosa. Mohd-Esa et al. (2010) testaram a atividade antioxidante em diferentes partes do hibisco comparando o extrato metanólico com o aquoso, constatando que o extrato alcoólico, embora metanólico, ofereceu uma determinação mais realista da atividade antioxidante, do que o extrato obtido através de água destilada.

Nas condições da presente pesquisa permite-se concluir que:

A atividade antimicrobiana do extrato alcoólico de cálices de hibisco foi superior ao extrato alcoólico dos frutos com sementes. O valor de antocianina também repetiu este resultado. Possivelmente exista uma relação direta entre a concentração de antocianina e a atividade antibacteriana em diferentes estruturas vegetais do hibisco.

A *Salmonella* Enteritidis mostrou-se mais sensível ao extrato alcoólico de cálices e *Escherichia coli* ao extrato alcoólico de frutos com sementes. As bactérias mais resistentes ao extrato de cálices e frutos com sementes foram *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, respectivamente, independente do acesso, do tempo de contato, da ausência ou presença de desestressores ou desinibidores bacterianos.

Os valores de IINIB foram relativamente maiores aos de IINAB em ambos os acessos e diferentes bactérias, independente do tempo de contato.

Diferentes acessos de hibisco apresentaram atividade antibacteriana distinta, provavelmente relacionada com solo, clima, disponibilidade de fitonutrientes e varietal, influenciando as concentrações e mesmo a qualidade de polifenóis totais e antocianinas nas diferentes estruturas.

Os resultados sugerem a continuidade de estudos envolvendo as diferentes estruturas do hibisco e os fatores responsáveis pela sua atividade antimicrobiana (polifenóis totais e antocianinas). Sugere-se também, observações sobre o emprego dos extratos do hibisco como condimentos ou conservantes alimentares, oportunizando alimentos naturais, sensorialmente agradáveis, na dimensão da segurança alimentar sustentável.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, pelo apoio e financiamento continuados. A CAPES pela bolsa de estudos de pós-graduação.

REFERÊNCIAS

AVANCINI, C.A.M. **Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. e Schlecht. – Hypericaceae (Guttiferae) – (“escadinha”, “sinapismo”) para uso como desinfetante e antisséptico.** 2002. 309p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre.

AVANCINI, C.A.M. & WIEST, J.M.; Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. E schlecht. - Guttiferae (“escadinha/sinapismo”) frente a diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.10, n.1, p.64-69, 2008.

CALLEGARI-JACQUES, L.M. **Bioestatística: princípios e aplicações.** Porto Alegre: Artmed, 2004. 255p.

CARVALHO, H.H.C.; CRUZ, F.T.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p.25-32, 2005.

CASTRO, N.E.A. et al., Planting time for maximization of yield of vinegar plant calyx (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.3, p.542-551, 2004.

CAVALLI-SFORZA, L. **Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistic (Biometria: fundamentos de estatística viológica-médica)**. Stuttgart: Gustav Fisher V. 1974. p.201-204.

CHAO, C.Y. & YIN, M.C. Antibacterial Effects of Roselle Calyx Extracts and Protocatechuic Acid in Ground Beef and Apple Juice. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.2, p. 201-206, 2009.

D' HEUREX- CALIX, F. & BADRIE, N. Consumer acceptance and physicochemical quality of processed red sorrel/roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) sauces from enzymatic extracted calyces. **Food Service Technology**, v.4, p.141–148, 2004.

DUKE, J.A. **The quest for tolerant germplasm**. In: _____. Crop tolerance to suboptimal land conditions. Madison: American Society of Agronomy, 1978. p.1-61. (ASA Special System, 82).

DVG (DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT). Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin. In: SCHLIESSER, T.; STRAUCH, D. **Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft**. Stuttgart: Enke v., 455p, 1981.

FALLER, A.L.K. & FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.43, n.2, p.211-218, 2009.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2 ed. São Paulo: Siqueira, p.532, 1959.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

GIROLOMETTO, G. **Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de Ilex paraguarienses A. St. Hill. ("erva mate") frente a bactérias zoonóticas em saúde e produção Animal**. 2005. 71p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

GOULD, G.W. Industry perspective on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **Journal of Food Protection**, v.58, n.1, p.82-86, 1995.

JULIANI, H. R., et al. Chemistry and Quality of Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for Developing the Natural-Product Industry in Senegal. **Journal of Food Science**, v.74, n.2, 2009.

KAROU D., DICKO M.H., SIMPORE J., TRAORE A.S. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.8, p.823-828, 2005.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; MORALES, M.T.; FETT, R. Frutas Tropicais Silvestres e Polpas de Frutas Congeladas: Atividade Antioxidante, Polifenóis e Antocianinas. **Revista Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1283-1287, 2006.

LAI, S. et al. Effects of oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone, and sodium tripolyphosphate on the development of oxidative rancidity in restructured chicken nuggets. **Journal of Food Science**, v.56, n.3, p.616-620, 1991.

LIU, K.S., TSAO, S.M. & YIN, M.C. In vitro antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. **Phytotherapy Research**, v.19, p.942–945, 2005.

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

MAHADEVAN, N.; SHIVALI & KAMBOJ, P. Hibiscus sabdariffa Linn. An overview. *Natural Product Radiance*, v.8, n.1, p.77-83, 2009

MARTINS, E. R. et al., **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1994. 220p.

MARTINS, M.A.S. **Vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.) uma riqueza pouco conhecida**. São Luiz: Emapa. 12p., 1985.

McCALEB, R. S. **Hibiscus production manual**. [S.l.: s.n.], 1998.

MING, L.C. Coleta de plantas medicinais. In DI STASI, L.C. **Plantas medicinais arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. Editora da UNESP. SP: 1996. p.69-86.

MOHD- ESA, N.M., et al. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. **Food Chemistry**, v.122, p.1055-1060, 2010.

MORTON, J.F. **Roselle, Fruits of warm climates** (pp. 281–286). Florida Flair Books, Miami, USA, 1987.

OLALEYE, M. T. Cytotoxicity and antibacterial activity of Methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.1 n.1, p.009-013, 2007.

PANIZZA, S. **Plantas que curam: cheiro de mato**. 18. ed. São Paulo: IBRASA, 1997. p.69-70.

PENG, Y. et al. Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.39, n.3-4, p.431-437, 2005.

PEREIRA, M. C. et al., Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.4, p.731-738, 2006.

ROMEIRO, R.S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Disciplina FIP- 640. Bactérias Fitopatogênicas, Roteiro das aulas práticas, Aula 08 Unidade 09 Técnica da microgota. Disponível em <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2009.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.35, p.275-280, 2004.

SÁYAGO-AYERDI, S.G.; ARRANZ S.; SERRANO J.; et al. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.19, p.7886-7890, 2007.

SOUZA, E.L. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. **Revista Higiene alimentar**, v.17, n.113, p.38-42, 2003.

SOUZA, A.A.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva-santa) usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul – Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.23-29, 2007.

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

TSAI, P. J. et al., Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract. **Food Research International**, v.35, p.351–356, 2002.

VILCHE, C., GELY, M., SANTALLA, E. Physical properties of quinoa seeds. **Biosystems Engineering**, v.86, n.1, p.59–65, 2003.

VINSON, J.A., SU X., ZUBIK, L., BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.11, p. 5315-5321, 2001.

WANG, C.J., WANG, J.M., LIN, W.L., CHU, C.Y., CHOU, F.P., TSENG, T.H. Protective effect of hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.38, n.5, p.411-416, 2000.

WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H.; AVANCINI, C. A. M.; GONÇALVES, A. R. Atividade anti-estafilócica em extratos de plantas com indicativo medicinal ou condimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.02, 2009 (a).

WIEST, J. M., CARVALHO, H. H. C., AVANCINI, C. A. M., GONÇALVES, A. R. Inibição e inativação *in vitro* de *Salmonella* spp. com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.119-127, 2009 (b).

WIEST, J. M., CARVALHO, H. H. C., AVANCINI, C. A. M., GONÇALVES, A. R. Inibição e inativação de *Escherichia coli* por extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. Atividade anti-*Escherichia* em plantas. **Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.3, p.474-480, 2009 (c).

CAPÍTULO 3

Reapresentação dos resultados.

3. REAPRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

Neste capítulo os resultados gerais do artigo serão reapresentados sob forma de gráficos.

3.1 Sensibilidade bacteriana

O Gráfico 1 apresenta a análise da sensibilidade das espécies bacterianas de interesse alimentar frente a extração alcoólica de cálices e frutos com sementes de hibisco, independente dos fatores tempo de confrontação, presença ou ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos e acesso.

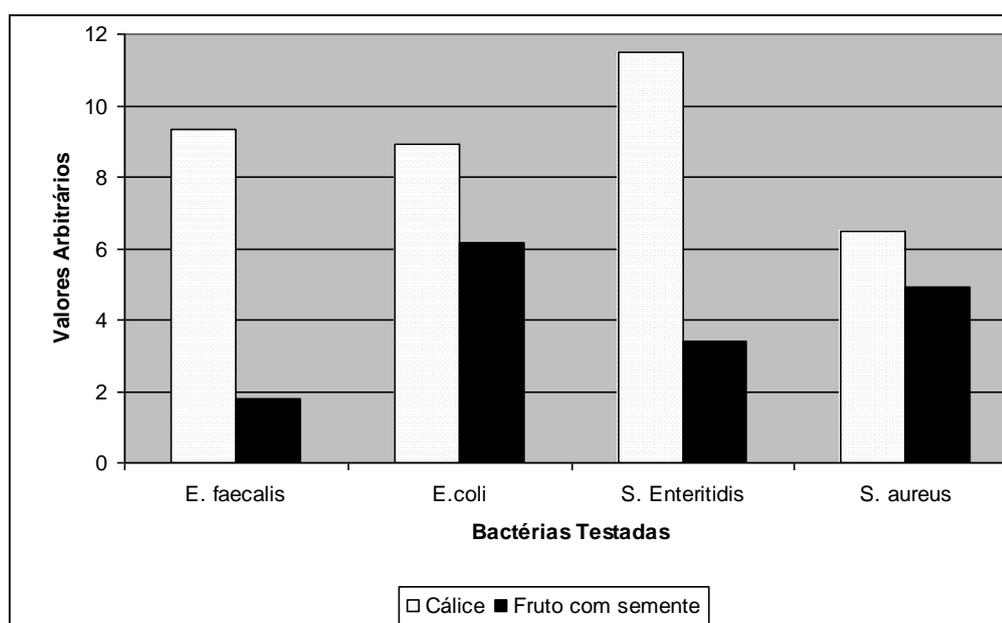


Gráfico 1- Análise da sensibilidade de quatro espécies bacterianas de interesse em alimentos frente à soluções conservantes alcoólicas de cálices e frutos com sementes de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), independente dos fatores de tempo de confrontação, presença ou ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos e acesso.

O extrato alcoólico de cálices apresentou atividade antimicrobiana maior do que o extrato alcoólico dos frutos com sementes do hibisco, independente de acesso, ou seja, o extrato alcoólico de cálices tem um poder antimicrobiano maior do que o extrato alcoólico dos frutos com sementes, fato que pode estar relacionado à maior quantidade de antocianinas nos cálices vermelhos do que se comparado aos frutos com sementes, que possui coloração verde (Gráfico1).

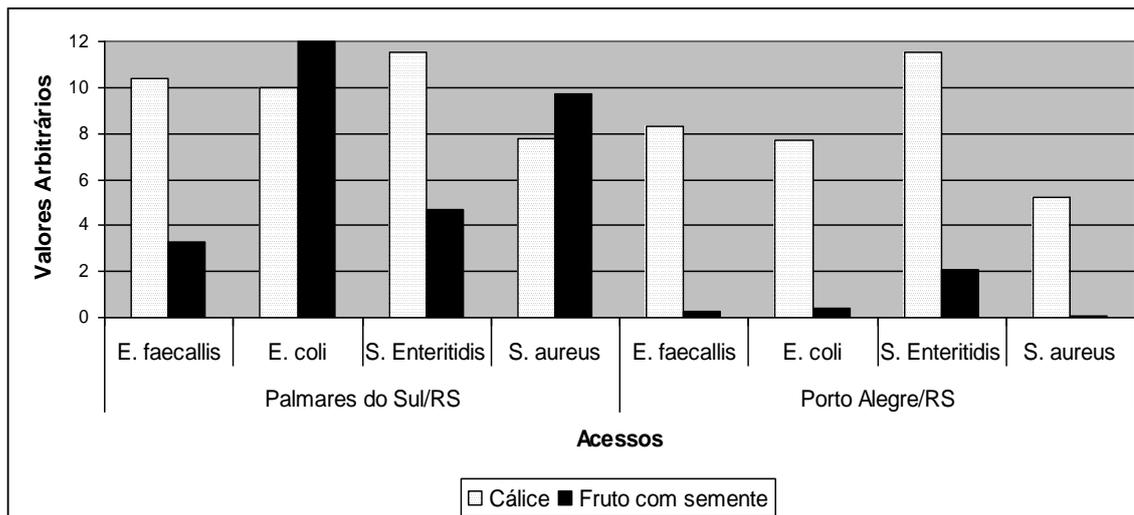


Gráfico 2- Análise da sensibilidade de quatro espécies bacterianas de interesse em alimentos frente à soluções conservantes dois acessos de cálices e frutos com sementes de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), independente dos fatores de tempo de confrontação, presença ou ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos.

Houve diferença significativa entre as bactérias confrontadas. No acesso Palmares do Sul/RS, *Salmonella Enteritidis* (11,5) foi a bactéria mais sensível ao extrato alcoólico de cálices de hibisco e *Staphylococcus aureus* (5,2) menos sensível. Já o extrato alcoólico dos frutos com sementes, no mesmo acesso, *Escherichia coli* (12) foi a bactéria mais sensível e *Enterococcus faecalis* (3,3), a mais resistente. No acesso Porto Alegre/RS o extrato alcoólico de cálices e o de frutos com sementes sensibilizou *Salmonella Enteritidis* (11,5 e 2,1), e a bactéria mais resistente foi *Staphylococcus áureos* (5,2 e 0,1) (Gráfico 2).

Diferentes acessos apresentaram atividade antibacteriana distinta, em ambas as estruturas vegetais, provavelmente relacionadas com solo, clima, disponibilidade de fitonutrientes e varietal, influenciando os teores do composto relacionado a atividade antimicrobiana.

3.2 Presença ou ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana

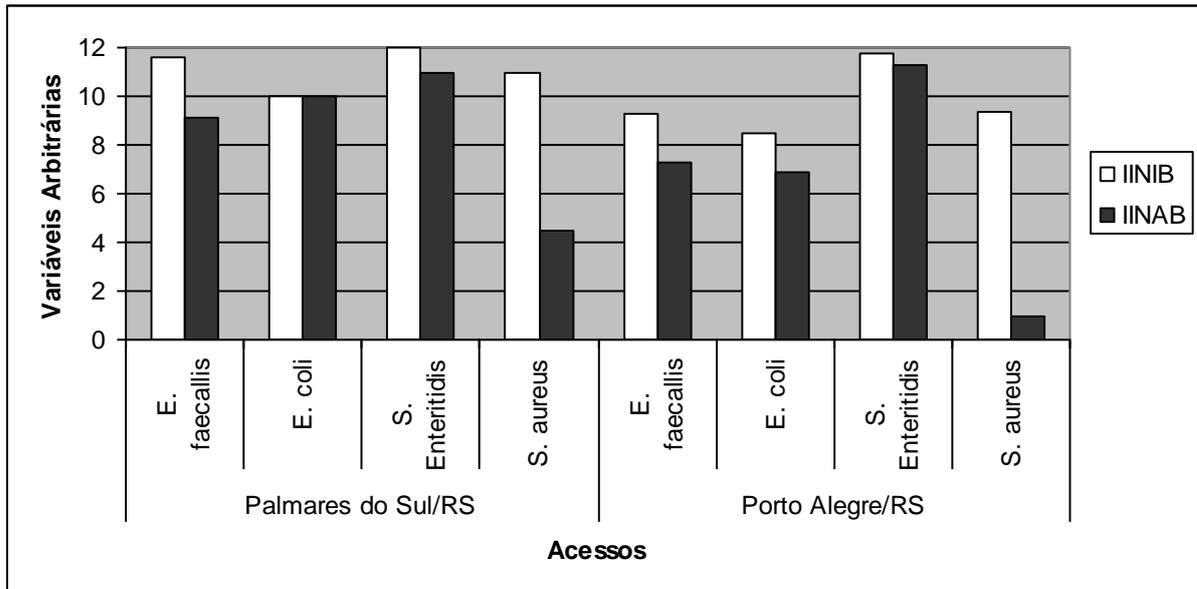


Gráfico 3- Análise da presença ou da ausência de desestressores / desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana de extrato alcoólico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), em dois acessos, independente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas.

Os valores de IINIB (sem desestressores/ bacteriostasia/ inibição) têm diferença significativa se relacionado aos valores de IINAB (com desestressores/ desinibidores/ bactericida) (Gráfico 3) para o extrato alcoólico de cálices, em ambos os acessos, independentes do tempo de confrontação, ou seja, este extrato teve uma ação bacteriostática maior do que bactericida.

Os maiores valores de IINIB e IINAB, de ambos os acessos, correspondem a bactéria *Salmonella* Enteritidis. Os menores valores de IINIB do acesso Palmares do Sul/RS e Porto Alegre/RS são de *Escherichia coli*, já os menores valores de IINAB, *Staphylococcus aureus*, em ambas as localidades (Gráfico 3).

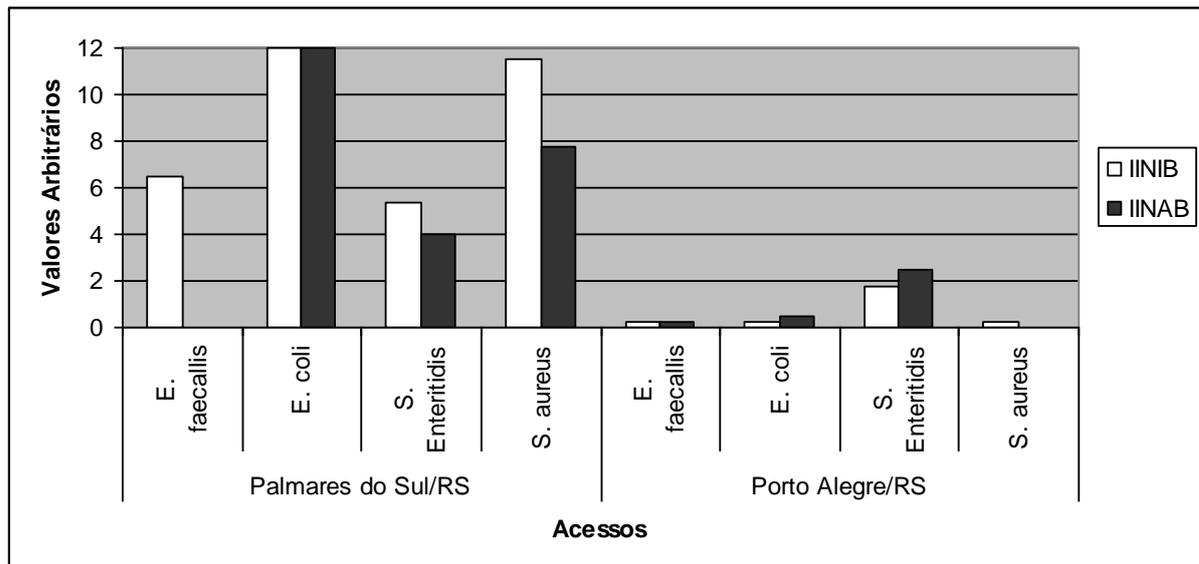


Gráfico 4- Análise da presença ou da ausência de desestressores/ desinibidores bacterianos na atividade antibacteriana do extrato alcoólico de frutos com sementes de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), em dois acessos, independente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas.

Os números arbitrários do IINIB e IINAB do acesso Palmares do Sul/RS encontram-se maiores do que os do acesso Porto Alegre/RS fato que pode ser atribuído ao solo, clima e constituintes químicos antimicrobianos específicos de cada local (Gráfico 4).

O IINAB de *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* foi zero, indicando a prevalência da atividade bacteriostática. Os valores de *Escherichia coli* acesso Palmares do Sul/RS (tanto para IINIB quanto IINAB) foram os mesmos (12) e no acesso Porto Alegre/RS, *Enterococcus faecalis* (0,3) também (Gráfico 4).

3.3 Teor de polifenóis totais e antocianinas e a atividade antimicrobiana dos extratos alcoólicos das diferentes estruturas de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco)

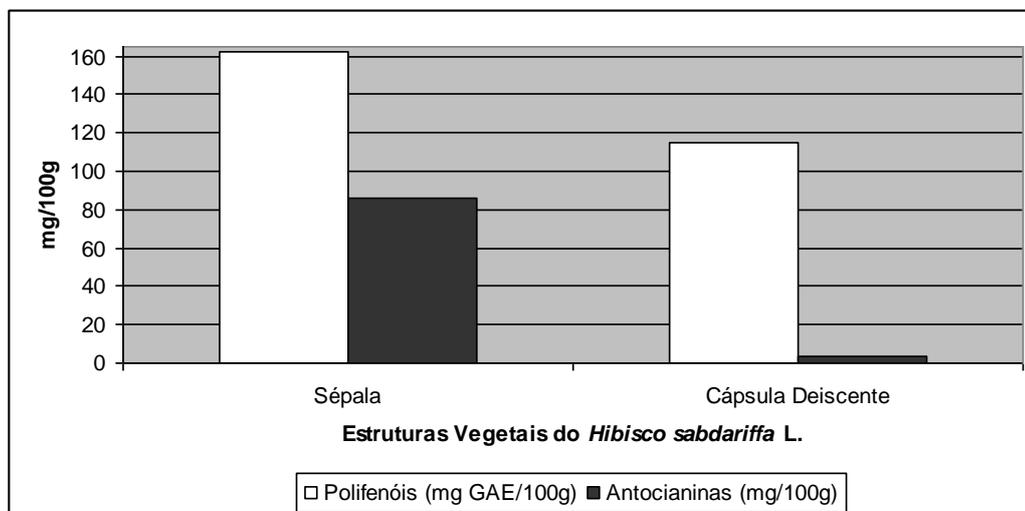


Gráfico 5 – Análise da quantidade de polifenóis totais e antocianinas nos extratos alcoólicos das diferentes estruturas vegetais do *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), independente acesso.

O extrato alcoólico de cálices do hibisco apresentou quantidades superiores e significativas de polifenóis totais e antocianinas quando relacionados ao extrato alcoólico de frutos com sementes. Igualmente, esta constatação foi feita na atividade antibacteriana. Existe, possivelmente, uma relação entre a quantidade de antocianinas e a atividade antibacteriana nas estruturas vegetais estudadas (Gráfico 5).

REFERÊNCIAS GERAIS

ACHA, P. N.; SZYFRES, B. Zoonosis y enfermedades transmissibles comunes al hombre y los animales. 3ªed. Washington, D.C.: Organización Panamericana de la Salud, 2003. v.1.

ALI-BRADELDIN, H.; AL- WABEL, N.; GERALD, B. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L: A review. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 369–375, 2005.

ASOLINI, F. C., et al. Atividade Antioxidante e Antibacteriana dos Compostos Fenólicos dos Extratos de Plantas Usadas como Chás. Braz. **Journal of Food Technology**, v.9, n.3, p.209-215, 2006.

ATTA, M. B. & IMAIZUMI, K. Some Characteristics of Crude Oil Extracted from Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Seeds Cultivated in Egypt. **Journal of Oleo Science**, v. 51, n. 7, p. 457-461, 2002.

AURELI, P.; COSTATINI, A.; ZOLEA, S. Antimicrobial activity of essential oils *Listeria monocytogenes*. **Journal of Food Protection**, Iowa, v.55, n.5, p.344-348, 1992.

AVANCINI, C.A.M. **Saneamento aplicado em saúde e produção animal: etnografia, triagem da atividade antibacteriana de plantas nativas no sul do Brasil e testes de avaliação do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. e *Schlecht.* – *Hypericaceae* (*Guttiferae*) – (“escadinha”, “sinapismo”) para uso como desinfetante e antisséptico.** 2002. 309p. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio grande do Sul, Porto Alegre.

AVANCINI,C.A.M. & WIEST, J.M.; Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. E *shlecht.* - *Guttiferae* (“escadinha/sinapismo”) frente a diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v.10, n.1, p.64-69, 2008.

BALAMI, A. The effect of processing conditions, packaging and storage on selected quality attributes of Mungza Ntusa (M.Sc. thesis). Nigeria: University of Ibadan, 1998.

BAYTOP, T. Health treatment in Turkey using plant extracts. **Publication of the Istanbul University**, n.3255, 1984.

BRAZ-FILHO, R.; **Química Nova**, v.17, n.5, 1994.

BRIDLE, P. & TIMBERLAKE, C.F. Anthocyanins as natural food colours-selected aspects. **Food Chemistry**, v.58, n.1-2, p.103-109, 1997.

BROUILLARD, R. Chemical structure of anthocyanins. In: MARKAKIS, P.(Ed) **Anthocyanins as food colors**. London: Academic Press. Cap.1, p.1-40, 1982.

CALLEGARI-JACQUES, L.M. **Bioestatística: princípios e aplicações**. Porto Alegre: Artmed, 2004. 255p.

CARVALHO, H.H.C.; CRUZ, F.T.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.7, n.3, p.25-32, 2005.

CASTRO, N.E.A. et al., Planting time for maximization of yield of vinegar plant calyx (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Ciência e Agrotecnologia**, v.28, n.3, p.542-551, 2004.

CAVALLI-SFORZA, L. **Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistic (Biometria: fundamentos de estatística viológica-médica)**. Stuttgart: Gustav Fisher V. 1974. p.201-204.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC), **Escherichia coli General Information**, março, 2008. Disponível em http://www.cdc.gov/nczved/dfbmd/disease_listing/stec_gi.html, acesso em 20.04.2009.

CHAO, C.Y. & YIN, M.C. Antibacterial Effects of Roselle Calyx Extracts and Protocatechuic Acid in Ground Beef and Apple Juice. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.6, n.2, p.201-206, 2009.

COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a postantimicrobial era. **Science**, v.257, n.11, p.1050-1055, 1992.

DASHAK, D.A., DAWANG, M.L., LUCAS, N.B., 2001. An assessment of the proximate chemical composition of locally produced spices known as dadawa basso and dadawa kalwa from three markets in Plateau State of Nigeria. **Food Chemistry**, v.75, n.2, p.231–235.

DESHPANDE, S.S., SALUNKHE, D.K., OYEWOLE, O.B., AZAM-ALI, S., BATTOCK, M. AND BRESSANI, R. Fermented grain legumes, seeds and nuts. A global perspective. **FAO Agricultural Services Bulletin**, 142: 1-53. Rome, Italy: FAO, 2000.

D' HEUREX- CALIX, F. & BADRIE, N. Consumer acceptance and physicochemical quality of processed red sorrel/roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) sauces from enzymatic extracted calyxes. **Food Service Technology**, v.4, p.141–148, 2004.

DOMÍNGUEZ-LÓPEZ, A., REMONDETTO, G.E., & NAVARRO-GALINDO, S.. Thermal kinetic degradation of anthocyanins in a Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L. cv. "Criollo") Infusion. **Journal of Food Science and Technology**, doi:10.1111/j.1365-2621.2006.01439.x, 2007

DUKE, J.A., & ATCHLEY, A.A. Proximate analysis. In B. R. Christie (Ed.), **The handbook of plant science in agriculture**. Boca Raton, Fla: CRC Press Inc, 1984.

DUKE, J.A. **The quest for tolerant germplasm.** In: _____. Crop tolerance to suboptimal land conditions. Madison: American Society of Agronomy, 1978. p.1-61. (ASA Special System, 82).

DVG (DEUTSCHE VETERINÄRMEDIZINISCHE GESELLSCHAFT). Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin. In: SCHLIESSER, T.; STRAUCH, D. **Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft.** Stuttgart: Enke v., 455p, 1981.

EL-ADAWY, T.A. & KHALIL, A.H. Characteristics of Roselle Seeds as a New Source of Protein and Lipid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1896-1900, 1994.

EMMY, H., AMIN, I., NORMAH, H., MOHD.-ESA, N., & AINUL, Z. A. B. Effects of defatted dried roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) seed powder on lipid profiles of hypercholesterolemia rats. **Journal of Science and Food Agriculture**, v.88, p.1043–1050, 2008.

ENGLE, M. B.; ENGLER, M.M., The vasculoprotective effects of flavonoid-rich cocoa and chocolate. **Nutrition Research**, v.24, p.695–706, 2004.

FALLER, A.L.K. & FIALHO, E. Disponibilidade de polifenóis em frutas e hortaliças consumidas no Brasil. **Revista de Saúde Pública**, v.43, n.2, p.211-218, 2009.

FARMACOPÉIA dos Estados Unidos do Brasil. 2 ed. São Paulo: Siqueira, p.532, 1959.

FAROMBI, E.O. & FAKOYA, A. Free radical scavenging and antigenotoxic activities of natural phenolic compounds in dried flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 49, p.1120–1128, 2005.

FAROMBI, E. O. & IGE, O.O. Hypolipidemic and antioxidant effects of ethanolic extract from dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* in alloxan-induced diabetic rats. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v.21, p.601–60, 2007.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar.** Porto Alegre: Artmed, 2002. 424p.

FOSTER, S. **Bilberry and herbal medicine.** 2000. Disponível em: <http://www.stevenfoster.com/education/monograph/bilberry.html>. Acesso em: 29 jun. 2009.

FRANZ, C.M.A.P *et al.*, Enterococci at the crossroad of food safety?. **International of Food Microbiology**, v.47, n.1-2, p.1-24, 1999.

FRANZ, C.M.A.P *et al.*, Enterococci in foods – a conundrum for food safety. **International of Food Microbiology**, v.88, n.2-3, p.105-122, 2003.

GERMANO, P.M.L. & GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** 3 ed. São Paulo: Manole, 2008.

GERMANO, P.M.L. & GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Manole, 2003.

GIROLOMETTO, G. **Avaliação da atividade antibacteriana de extratos de *Ilex paraguariensis* A. St. Hill. (“erva mate”) frente a bactérias zoonóticas em saúde e produção Animal**. 2005. 71p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração Ciências Veterinárias) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

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

GOTLIEB, O. New and underutilized plants in the Americas: solution to problems of inventory through systematics. **Interciência**, v.6, n.1, p.22-29, 1981.

GOULD, G.W. Industry perspective on the use of natural antimicrobials and inhibitors for food applications. **Journal of Food Protection**, v.58, n.1, p.82-86, 1995.

GONÇALVES, A.L. et al., Estudo Comparativo da Atividade Antimicrobiana de Extratos de Algumas Plantas Nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.3, p.353-358, 2005.

HAMBURGER, M. & HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: the link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**, v.30, p.3864–3874, 1991.

HIRUNPANICH, V.; UTAIPAT, A.; MORALES, N.P.; BUNYAPRAPHATSARA, N.; SATO, H.; HERUNSALE, A.; SUTHISISANG, C. Hypocholesterolemic and antioxidant effects of aqueous extracts from the dried calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. in hypercholesterolemic rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.103, p.252–260, 2006.

IGARASHI, K. et al. Antioxidative activity of major anthocyanin isolated from wild grapes (*Vitis coignetiae*). **Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi**, v.36, p.852–856, 1989.

JAY, JAMES, M. **Microbiologia dos Alimentos**. 6ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 771p.

JÚNIOR, A. A & VIZZOTTO, V.J.; **Revista Agropecuária Catarinense**, v.9, n.5, 1996.

JULIANI, H. R., et al. Chemistry and Quality of Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for Developing the Natural-Product Industry in Senegal. **Journal of Food Science**, v.74, n.2, 2009.

KAROU D., DICKO M.H., SIMPORE J., TRAORE A.S. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. **African Journal of Biotechnology**, v.4, n.8, p. 823-828, 2005.

KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, A.G.; MORALES, M.T.; FETT, R. Frutas Tropicais Silvestres e Polpas de Frutas Congeladas: Atividade Antioxidante, Polifenóis e Antocianinas. **Revista Ciência Rural**, v.36, n.4, p.1283-1287, 2006.

LAI, S. et al. Effects of oleoresin rosemary, tertiary butylhydroquinone, and sodium tripolyphosphate on the development of oxidative rancidity in restructured chicken nuggets. **Journal of Food Science**, v.56, n.3, p.616-620, 1991.

LIU, K.S., TSAO, S.M. & YIN, M.C. In vitro antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. **Phytotherapy Research**, v.19, p.942–945, 2005.

LIMA, V.L. A G. et al., Correlação entre o Teor de Antocianinas e Caracterização Cromática de Polpas de Diferentes Genótipos de Aceroleira. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.10, n.1, p.51-55, 2007.

LIN, T.L., LIN H.H., CHEN, C.C., LIN M.C., CHOU, M.C., WANG, C.J. *Hibiscus sabdariffa* extract reduces serumcholesterol in men and women. **Nutrition Research**, v.27, p.140–145, 2007.

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

MAHADEVAN, N.; SHIVALI & KAMBOJ, P. *Hibiscus sabdariffa* Linn. An overview. **Natural Product Radiance**, v.8, n.1, p.77-83, 2009

MARIUTTI, L. R. B. et al., Revisão: Antioxidantes Naturais da Família Lamiaceae. Aplicação em Produtos Alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.10, n.2, p.96-103, 2007.

MARTINS, E. R. et al., **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1994. 220p.

MARTINS, M.A.S. **Vinagreira (*Hibiscus sabdariffa* L.) uma riqueza pouco conhecida**. São Luiz: Emapa. 12p., 1985.

MAZZA, G., et al., **Anthocyanins in Fruits, Vegetables, and Grains**. Boca Raton, Fla: CRC Press; 1993.

McCALEB, R. S. **Hibiscus production manual**. [S.l.: s.n.], 1998.

MING, L.C. Coleta de plantas medicinais. In DI STASI, L.C. **Plantas medicinais arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. Editora da UNESP. SP: 1996. p.69-86.

MOHD- ESA, N.M., et al. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. **Food Chemistry**, v.122, p.1055-1060, 2010.

MORTON, J.F. **Roselle, Fruits of warm climates**. Florida Flair Books, Miami, USA, p.281–286, 1987.

MUÑOZ-ESPADA, et al., Antocyanin qualification and radical scavenging capacity of Concord, Norton, and Marechal Foch Grapes and wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.6679-6786, 2004.

NASCIMENTO, G.G.F. et al. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.2, p.247-256, 2000.

NNAM, N.M. & ONYEKE, N.G. Chemical composition of two varieties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa* L.), calyces and the drinks made from them. **Plant Foods for Human Nutrition**, v.58, p.1–7, 2003.

OBOH, G. & ELUSIYAN, C. A. Nutrient Composition and Antimicrobial Activity of Sorrel Drinks. **Journal of Medicinal Food**, v.7, n.3, p.340-342, 2004.

ODIGIE, I.P.; ETTARH, R.R e ADIGUN SA. Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1C hypertensive rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.86, p.181–185, 2003.

OLALEYE, M. T. Cytotoxicity and antibacterial activity of Methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. **Journal of Medicinal Plants Research**, v.1 n.1, p.009-013, 2007.

PANIZZA, S. **Plantas que curam: cheiro de mato**. 18. ed. São Paulo: IBRASA, 1997. p.69-70.

PENG, Y. et al. Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.39, n.3-4, p.431-437, 2005.

PEREIRA, M. C. et al., Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. **Ciência e Agrotecnologia**, v.30, n.4, p.731-738, 2006.

PRENESTI, E., BERTO, S., DANIELE, P.G., TOSO, S. Antioxidant power quantification of decoction and cold infusions of *Hibiscus sabdariffa* flowers. **Food Chemistry**, v.100, n.2, p.433–438, 2007.

ROMEIRO, R.S. **Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão**. Laboratório de Bacteriologia de Plantas, Disciplina FIP- 640. Bactérias Fitopatogênicas, Roteiro das aulas práticas, Aula 08 Unidade 09 Técnica da microgota. Disponível em <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>>. Acesso em: 05 abr. 2009.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A.L.M.; DELARMELINA, C.; FIGUEIRA, G.M.; DUARTE, M.C.T.; REHDER, V.L.G. Composition and antimicrobial activity of essential oils aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, n.35, p.275-280, 2004.

SÁYAGO-AYERDI, S.G.; ARRANZ S.; SERRANO J.; et al. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.19, p.7886-7890, 2007.

SCALBERT, A. & WILLIAMSON, G. Dietary Intake and Bioavailability of Polyphenols. **Journal of Nutrition**, v.130, p.2073S- 2085S, 2000.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects os spices. **Journal of Food Safety**, Westport, n.6, p.29-44, 1983.

SOUZA, E.L. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. **Revista Higiene alimentar**, v.17, n.113, p.38-42, 2003.

SOUZA, A.A.; WIEST, J.M. Atividade antibacteriana de *Aloysia gratissima* (Gill et Hook) Tronc. (garupá, erva-santa) usada na medicina tradicional no Rio Grande do Sul – Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, n.3, p.23-29, 2007.

STEINMETZ, K.A. & POTTER, J.D. Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. **Journal of the American Dietetic Association**, v.6, p.1027–1039, 1996.

STROHL, W. A., ROUSE, H. & FISCHER, B. D. **Microbiologia Ilustrada**. Porto Alegre: 2004.

TALAVERA, S. et al. Anthocyanins are efficiently absorbed from the stomach in anesthetized rats. **Journal of Nutrition**, v.133, p.4178-4182, 2003.

TAMURA, H., & YAMAGAMI, A. Antioxidative activity of monoacylated anthocyanins isolated from Muscat Bailey A grape. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.42, p.1612–1615, 1994.

TEE, P.L., YUSOF, S., MOHAMED, S. Antioxidative properties of Roselle (*Hibiscus sabdariffa*)L. in linoleic acid model system. **Nutrition & Food Science**, v.32, n.1, p.17–20, 2002.

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

TESKE, M.; TRENTINI, A. M. M.; *Compêndio de Fitoterapia*, 2a. ed., Herbarium Lab. Botânico, Curitiba, Paraná, 1995.

TSAI, P. J. et al., Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract. **Food Research International**, v.35, p.351–356, 2002.

TSAI, P.J. & HUANG, H.P., 2004. Effect of polymerization on the antioxidant capacity of anthocyanins in Roselle. **Food Research International**, n.37, v.4, p.313–318, 2004.

TSAI, P. J., & OU, A. S. M. Colour degradation of dried roselle during storage. **Food Science**, v.23, p.629–640, 1996.

TSENG, T.H., KAO, E.S., CHU, C.Y., CHOU, F.P., LIN WU, H.W., WANG, C.-J.. Protective effects of dried flower extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. against oxidative stress in rat primary hepatocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v.35, p.1159–1164, 1997.

VELGE, P. et al., Emergence of *Salmonella* epidemics : The problems related *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and multiple antibiotic resistance in other major serotypes. **Veterinary Research**, v.36, n. 3, p. 267-288, 2005.

VILCHE, C., GELY, M., SANTALLA, E. Physical properties of quinoa seeds. **Biosystems Engineering**, v.86, n.1, p.59–65, 2003.

VINSON, J.A., SU X., ZUBIK, L., BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, n.11, p. 5315-5321, 2001.

WANG, C.J., WANG, J.M., LIN, W.L., CHU, C.Y., CHOU, F.P., TSENG, T.H. Protective effect of hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.38, n.5, p.411-416, 2000.

WIEST, J. M.; CARVALHO, H. H.; AVANCINI, C. A. M.; GONÇALVES, A. R. Atividade anti-estafilócica em extratos de plantas com indicativo medicinal ou condimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.02, 2009 (a).

WIEST, J. M., CARVALHO, H. H. C., AVANCINI, C. A. M., GONÇALVES, A. R. Inibição e inativação *in vitro* de *Salmonella* spp. com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.1, p.119-127, 2009 (b).

WIEST, J. M., CARVALHO, H. H. C., AVANCINI, C. A. M., GONÇALVES, A. R. Inibição e inativação de *Escherichia coli* por extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. **Revista Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.29, n.3, 2009 (c).

WONG, P. K., YUSOF, S., GHAZALI, H. M., & CHE MAN, Y. B. Physico-chemical characteristics of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Nutrition and Food Science**, v.32, p.68–73, 2002.

YAGOUB, A. E. G.; et al. Study on Furundu, a Traditional Sudanese Fermented Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Seed: Effect on *in Vitro* Protein Digestibility, Chemical Composition, and Functional Properties of the Total Proteins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 6143–6150, 2004.

ZAICA, L.L. Spices and herbs: their antimicrobial activity and its determinir **Journal of Food Safety**, v.9, p. 97–118, 1988.

**APÊNDICE A - Laudo de Identificação Botânica – *Hibiscus sabdariffa* L.
(MALVACEAE)**

| Família Botânica | Nome Científico | Nome Popular | Hábito | Habitat | Origem | Nº ICN |
|-------------------------|--------------------------------------|-----------------------------|------------------|----------------|----------------|--------------------------|
| MALVACEAE | <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. | Vinagreira, azedinha | Arbustivo | Quintal | América | 165038 165039 |

Fonte: Marodin (2010)

MATERIAL EXAMINADO:

Nome Científico: *Hibiscus sabdariffa* L.

Material examinado: *Hibiscus sabdariffa*: ARGENTINA. Corrientes, dep. Mburucuyá, 3.V.1964, A. Krapovickas y C.L. Cristóbal 11423. BRASIL. RIO GRANDE DO SUL, Viamão, Centro Agrícola Demonstrativo (CAD), 9.III.2004, V.F. Kinupp 2908. Palmares do Sul, 28. V. 2010, J.M. Wiest ICN (165038); Porto Alegre, Lami, 11.VI.2010, Vera Lúcia ICN (165039).

Sílvia Maria Marodin

Bióloga CRBio/RS Nº 17268-03D,
Mestre em Botânica, área de Taxonomia