

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

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

RIALA6/1491

Mônica Jachetti MACIEL*, Marcelo Pinto PAIM, Heloisa Helena Chaves CARVALHO, José Maria WIEST

*Endereço para correspondência: Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento Gonçalves, 9.090, Caixa Postal 15.094, CEP: 91540-000, Porto Alegre, RS, Brasil. Telefone: (51) 8151-8345, (51) 3308-6123. E-mail: moni.jm@hotmail.com
Recebido: 22.12.2011 – Aceito para publicação: 12.08.2012

RESUMO

O hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) possui propriedades antioxidantes e antimicrobianas, e pode ser utilizado como planta medicinal e alimento funcional. Este estudo determinou a intensidade de atividade de inibição (IINIB) e a inativação bacteriana (IINAB) *in vitro* de dois extratos alcoólicos, obtidos de cálices e frutos com sementes de diferentes acessos de hibisco. As análises foram efetuadas sobre as bactérias de padrão internacional, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Salmonella* Enteritidis e *S. aureus*, associando-se os resultados aos polifenóis totais e antocianinas. Diferenças significativas na atividade antimicrobiana dos extratos alcoólicos foram observadas em ambos os acessos. *Salmonella* Enteritidis (11,5) e *E. coli* (12) foram as bactérias mais sensíveis, respectivamente, aos extratos alcoólicos de cálices de hibisco e dos frutos com sementes. *S. aureus* (5,2 e 0,1) foi a mais resistente a ambos os extratos. Os valores de IINIB foram predominantemente maiores quando comparados aos de IINAB, o que indica que geralmente a atividade bacteriostática é maior do que a bactericida. Os valores de polifenóis totais e de antocianinas do extrato alcoólico de cálices apresentaram diferença significativa e foram superiores aos do extrato alcoólico dos frutos com sementes. Possivelmente exista associação 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, antioxidantes, antocianinas.

ABSTRACT

The hibiscus (*Hibiscus sabdariffa* L.) has antioxidant and antimicrobial properties, it can be used as functional food and medicinal plant. This study aimed at determining the intensity of activity inhibition (IINIB) and of inactivation (IINAB) of two alcoholic extracts obtained from calyxes and fruits with seeds of different accesses of hibiscus on international standards bacterial *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Salmonella* Enteritidis and *Staphylococcus aureus*. And the correlation between these results and the presence of total polyphenols and anthocyanins was done. The antimicrobial activity of alcoholic extract from both accesses showed a significant difference. While *Salmonella* Enteritidis (11,5) and *Escherichia coli* (12) were more susceptible to the alcoholic extract from hibiscus calyxes and fruits with seeds, respectively, the *Staphylococcus aureus* (5.2 e 0.1) was the most resistant in both extracts. The IINIB values were higher than IINAB values, showing that the bacteriostatic activity was usually higher than the bactericide. Total polyphenols and anthocyanins contents in calyxes alcoholic extract showed a significant difference, and they were higher than in alcohol extract from fruits with seeds. It seems likely that occurs a direct correlation between the anthocyanin concentration and the antibacterial activity in different structures of the hibiscus plant.

Keywords. *Hibiscus sabdariffa* L., bacterial inhibition, bacterial inactivation, antioxidants, anthocyanin.

INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem havido uma intensa preocupação pela disponibilidade de uma alimentação de qualidade e natural, pois os alimentos que contêm altos níveis de conservantes para redução da carga microbiana são indesejáveis. Desse modo, a pressão por parte dos consumidores se volta para uma maior produção de alimentos frescos, com conservantes naturais e maior garantia de segurança¹.

Existe grande interesse em substituir os conservantes artificiais por conservantes naturais nos alimentos. As substâncias naturais, de origem vegetal, tornam o alimento mais atrativo ao consumidor², além de aumentar a vida útil pela capacidade bacteriostática e bactericida, retardando o início da deterioração e o crescimento de micro-organismos indesejáveis³. Já o uso inadequado de antibióticos sintéticos faz com que micro-organismos patogênicos apresentem resistência a medicamentos, havendo a necessidade de novos antimicrobianos de fontes naturais⁴. O mesmo ocorre com os antioxidantes sintéticos, restritos tanto pela aplicação quanto pela quantidade⁵.

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, groselheira⁶, o hibisco é uma espécie vegetal da família Malvaceae, proveniente da África Oriental⁷, e foi introduzido no Brasil pelos escravos⁸.

Arbusto de ciclo anual, o hibisco pode atingir mais de 1,80 m de altura, é pouco ramificado e com a forma de taça de tonalidade vermelha⁹. Cultivado em regiões tropicais e subtropicais, a flor é simples, séssil e axilar. A corola é composta por cinco sépalas de intensa coloração vermelha em forma de cone, que forma o cálice. Na base do cálice, está o cálculo ou o pequeno cálice disposto em círculo¹⁰. A cápsula deiscente é o fruto que possui aspecto aveludado e cerca de 2 cm de comprimento, abrigando as sementes¹¹.

O hibisco é alimento funcional nos países da Ásia (Japão, China, Coreia e Taiwan)¹², e o interesse econômico está nos cálices desidratados, utilizados mundialmente para a produção de bebidas, alimentos¹³, conservantes¹² e antioxidantes¹⁴. No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa), por meio da Portaria nº 519, de 1998¹⁵, considera que as flores do hibisco podem ser consumidas como chá, preparadas por meio de infusão ou

decoção. Já as sementes do fruto do *Hibiscus sabdariffa* L. surgem como subproduto concomitante ao cultivo em larga escala e a exploração comercial da planta¹⁶. Essas estruturas vegetais podem ser fonte de antioxidantes. Ao serem trituradas, são utilizadas na alimentação humana como fonte expressiva de proteína e, se torradas, são substitutas do café¹⁷. Alguns autores, como Chao e Yin¹⁸, relatam uma possível relação entre a quantidade de antocianinas e a atividade antimicrobiana do hibisco.

Um estudo realizado por Akindahunsi e Olaleye¹⁹ concluiu que, em ratos, a média de consumo de 150-180 mg/kg/dia do extrato aquoso-etanólico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. mostrou-se segura. Entretanto, o consumo em altas doses pode elevar a atividade de algumas enzimas no plasma.

Este trabalho teve como objetivo avaliar a Intensidade de Atividade de Inibição Bacteriana (IINIB) e de Inativação Bacteriana (IINAB) *in vitro* de dois extratos alcoólicos obtidos de cálices e frutos com sementes de diferentes acessos (Palmares do Sul [RS] e Porto Alegre [RS]) de *Hibisco sabdariffa* L. (hibisco) frente a agentes bacterianos de padrões internacionais, relacionando esses resultados à presença de polifenóis totais e antocianinas.

MATERIAL E MÉTODOS

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

Os ramos do hibisco (*Hibisco sabdariffa* L.) *in natura* foram coletados em Palmares do Sul, Bacupari (coordenadas 30°16'S e 50°28'O) e Porto Alegre, e Lami (coordenadas 30°14'S e 51°06'O). As amostras foram identificadas botanicamente e encaminhadas como exsiccatas para registro no Herbário do Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, recebendo os registros ICN 165038 (acesso Palmares do Sul) e ICN 165039 (acesso Porto Alegre).

Foram separados manualmente os cálices e os cálculos, restando os frutos com as sementes do hibisco. O termo "cálice", neste trabalho, envolve o cálice propriamente dito e o pequeno cálice ou cálculo. O termo "fruto com semente" envolve a cápsula deiscente e as sementes do hibisco. Os componentes vegetais do hibisco foram colocados, separadamente, em álcool etílico de cereais (Farmaquímica®, Porto Alegre) a 96 °GL, na

Tabela 1. Valores ordinais arbitrários referentes a 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 ⁻¹ – 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 ⁻¹ – doses infectantes inibidas ou inativadas

n.a: ausência de atividade antibacteriana; UFC.mL⁻¹: unidades formadoras de colônias por mL.

proporção de 400 g de cálices/frutos com sementes para 1.000 mL de álcool, na extração alcoólica. Após quinze dias, foram submetidos à destilação fracionada sob pressão reduzida em sistema rota vapor, desprezando-se a porção alcoólica e reidratando-se o extrato resultante com água destilada estéril, reconstituindo-se as concentrações iniciais dos componentes²⁰. Para o controle da assepsia dos procedimentos de extração e reconstituição de todos os extratos, utilizou-se o caldo Cérebro e coração (BHI, Himedia®, Mumbai, Índia), confirmando a esterilidade posteriormente por plaqueamento em Agar Nutriente (Nutrient Agar, Acumedia®, Maryland, Baltimore, EUA).

Foram utilizados quatro agentes bacterianos de padrões internacionais (ATCC– American Type Culture Collection), *Staphylococcus aureus* (25923), *Enterococcus faecalis* (19433), *Escherichia coli* (11229) e *Salmonella* Enteritidis (11076). Essas bactérias pertenciam ao Laboratório de Higiene do ICTA/UFRGS e foram ativadas para atingir concentração $\geq 1,0 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹ para confrontação com os extratos alcoólicos de cálices e frutos com sementes de hibisco, por meio de diluições seriais logarítmicas²⁰. A avaliação da concentração inicial foi realizada por meio da técnica da microgota²¹, e a contagem de micro-organismos viáveis foi realizada em placas de Petri contendo meio de cultura BHI (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) até a obtenção da diluição 10⁻¹². De cada diluição foram transferidas três gotas para placas de Petri utilizando micropipetas de 15 µL, e a leitura foi realizada em intervalos de 24, 48, 72 e 144 horas de incubação aeróbia a 37 °C. O valor final considerado foi constituído da média das contagens das gotas triplicadas, avaliadas biometricamente segundo Cavalli-Sforza²².

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)²³ com base na técnica do sistema de tubos múltiplos, modificada por Avancini e Wiest²⁰, confrontando-se os diferentes extratos com 12 diluições seriais logarítmicas (10⁻¹ a 10⁻¹² UFC.mL⁻¹) 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 desse confronto, porém sob a influência de desestressores/desinibidores bacterianos como Tween 80 (Reação Química®, Porto Alegre), L-histidina (Labsybt®, Diadema, SP) e lecitina de soja (Herbarium®, Colombo, PR), acrescidos ao mesmo BHI²⁰. Os resultados são expressos em valores que são representações da atividade biológica inibitória/bacteriostasia ou inativadora/bactericidia de diferentes soluções antibacterianas sobre diferentes micro-organismos, 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.

Para saber se existe diferença significativa entre as variáveis, aplicou-se a análise de variância – ANOVA (Microsoft Excel para Windows), seguida pelo teste de Tukey. Esse teste é um complemento à ANOVA e visa identificar quais médias, tomadas duas a duas, diferem significativamente entre si²⁴. A sua utilização teve como objetivo avaliar as diferenças existentes entre os quatro inóculos (padrões bacterianos internacionais).

A extração de polifenóis totais foi realizada segundo a metodologia de Vinson et al.²⁵, com modificações. Amostras de 100 µL do extrato (cálices e frutos com sementes) foram colocadas em tubos tipo eppendorf, sendo acrescidos 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®, Alemanha) (5.000 rpm/5 minutos) e os sobrenadantes foram obtidos, sendo estes denominados extratos de polifenóis totais. As extrações foram realizadas em duplicata.

A determinação de polifenóis totais foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu (Proton Química®, RS) segundo Karou et al.²⁶. A solução de Folin foi preparada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu e água deionizada 1:1 (v/v). Em tubo tipo *eppendorf*, 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®, Japão) a 750 nm 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.

O conteúdo de antocianinas totais foi determinado pelo método da diferença de pH em que se dissolve dois sistemas tampão, o cloreto de potássio (Merck®, BR) pH 1 (0,025 M) e acetato de sódio (Synth®, BR) pH 4,5 (0,4 M). 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 700 nm (Kuskoski et al.²⁷, com modificação).

Utilizou-se a equação para determinar a absorbância:

$$A = (A_{\text{máx.vis.}(540 \text{ nm})} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}1} - (A_{\text{máx.vis.}(540 \text{ nm})} - A_{700 \text{ nm}})_{\text{pH}4,5}$$

O cálculo das antocianinas foi baseado em Teixeira et al.²⁸, modificado para:

$$\text{AntT (mg } 100.\text{g}^{-1}\text{): } [D.O. \times F.D. \times 1000X P.M.] / [Fex \times m]$$

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

A análise da sensibilidade das bactérias testadas frente à 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 obteve poder antibacteriano maior do que o extrato alcoólico dos frutos com sementes do hibisco. Fato que, possivelmente, pode estar relacionado à 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 e Yin¹⁸, que, utilizando o extrato alcoólico e aquoso de cálices de hibisco e ácido protocatecuico contra bactérias de interesse alimentar, constataram possível relação entre os compostos fenólicos e o efeito antibacteriano dos extratos de cálices de hibisco.

Independentemente do acesso, somente considerando a estrutura vegetal, *Salmonella* Enteritidis e *Escherichia coli* foram as bactérias mais sensíveis ao extrato alcoólico de cálices de hibisco e de frutos com sementes, respectivamente (Tabela 2). Nos dois extratos, *Staphylococcus aureus* expressou a maior resistência. Carvalho et al.²⁹, ao estudarem a atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar, concluíram que a bactéria *Salmonella* Enteritidis demonstrou, predominantemente, a maior sensibilidade aos diferentes extratos.

Analisando as atividades antimicrobianas relacionadas aos acessos e às diferentes estruturas vegetais (Tabela 2) no extrato alcoólico de cálices de Palmares do Sul, a bactéria mais sensível foi *Salmonella* Enteritidis e a mais resistente, *Staphylococcus aureus*. No extrato alcoólico de frutos com sementes, o maior valor arbitrário representando a maior sensibilidade foi *Escherichia coli* e demonstrando maior resistência, *Enterococcus faecalis*. No acesso Porto Alegre, a maior sensibilidade demonstrada foi da *Salmonella* Enteritidis para ambos os extratos, porém, a maior resistência foi manifestada pela *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, nos extratos alcoólicos de cálices e frutos com sementes. Diversos fatores, dentre os quais temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, micro e macronutrientes disponíveis, altitude, poluição atmosférica e indução por estímulos mecânicos³⁰ podem estar influenciando a atividade secundária de plantas medicinais e, conseqüentemente, poderiam estar alterando os teores

Tabela 2. Análise da sensibilidade de quatro espécies bacterianas frente aos extratos de dois acessos de cálices e de frutos com sementes de *Hibiscus sabdariffa* L., independentemente dos fatores de tempo de confrontação, presença ou ausência de desestressores/desinibidores bacterianos

Espécie bacteriana	Valores Arbitrários*		Valor p
	Cálices	Frutos com sementes	
Acesso Palmares do Sul/RS			
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	10,4 ^b	3,3 ^a	p < 0,05
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	10 ^b	12 ^b	p < 0,05
<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			
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	8,3 ^b	0,3 ^a	p < 0,05
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	7,7 ^c	0,4 ^a	p < 0,05
<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 11076)	11,5 ^a	2,1 ^b	p < 0,05
<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 na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (p < 0,05). Valor p < 0,05 indica diferença significativa entre os valores de IINIB e IINAB pela Análise de Variância (ANOVA), considerando-se espécies bacterianas e acessos.

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., independentemente dos fatores tempo de confrontação, considerando-se espécies bacterianas

Espécie bacteriana	Palmares do Sul/RS			Porto Alegre/RS		
	IINIB*	IINAB*	Valor p	IINIB*	IINAB*	Valor p
<i>Enterococcus faecalis</i>	11,6 ^b	9,1 ^b	p < 0,05	9,3 ^b	7,3 ^b	p < 0,05
<i>Escherichia coli</i>	10 ^a	10 ^a	p > 0,05	8,5 ^a	6,9 ^c	p < 0,05
<i>Salmonella</i> Enteritidis	12 ^c	11 ^c	p < 0,05	11,8 ^c	11,3 ^a	p > 0,05
<i>Staphylococcus aureus</i>	11 ^b	4,5 ^b	p < 0,05	9,4 ^b	1 ^d	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 na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (p < 0,05). Valor p < 0,05 indica diferença significativa entre os valores de IINIB e IINAB pela Análise de Variância (ANOVA), considerando-se espécies bacterianas e acessos.

do composto relacionado à atividade antimicrobiana dos diferentes acessos de hibisco.

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* do acesso Palmares do Sul, 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, Carvalho et al.²⁹ também encontraram resultados superiores para IINIB em relação ao IINAB.

Os maiores valores arbitrários de IINIB e IINAB, tanto para o acesso Palmares do Sul quanto para o acesso Porto Alegre, foram os valores da bactéria *Salmonella* Enteritidis (Tabela 3). Os menores valores de IINIB,

para ambos os acessos, foi de *Escherichia coli*. E, em relação à IINAB, em ambos os acessos, Palmares do Sul e Porto Alegre apresentaram os menores valores frente a *Staphylococcus aureus*.

Olaley³¹ testou o extrato alcoólico de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. como um agente antibacteriano frente aos micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Bacillus stearothermophilus*, *Micrococcus luteus*, *Serratia marsecences*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas fluorescence*. O extrato obteve excelente atividade antibacteriana frente aos micro-organismos testados. A atividade antibacteriana do hibisco pode ser comparada à da Estreptomina, mas a Estreptomina não inibe *E. coli*. Porém, nesta pesquisa, o extrato alcoólico de cálices do hibisco sem os desinibidores apresentou valores arbitrários maiores tanto para *Staphylococcus aureus* quanto para *Escherichia coli*, nos acessos Palmares do Sul e Porto Alegre, 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., independentemente dos fatores tempo de confrontação, considerando-se espécies bacterianas

Espécie bacteriana	Palmares do Sul/RS			Porto Alegre/RS		
	IINIB*	IINAB*	Valor p	IINIB*	IINAB*	Valor p
<i>Enterococcus faecalis</i>	6,5 ^b	0 ^a	p < 0,05	0,3 ^{ad}	0,3 ^{ad}	p > 0,05
<i>Escherichia coli</i>	12 ^a	12 ^b	p > 0,05	0,3 ^{bd}	0,50 ^{bd}	p < 0,05
<i>Salmonella</i> Enteritidis	5,4 ^c	4 ^c	p > 0,05	1,8 ^c	2,5 ^c	p < 0,05
<i>Staphylococcus aureus</i>	11,5 ^d	7,8 ^d	p < 0,05	0,3 ^{ab}	0 ^{ab}	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 na mesma coluna indicam diferenças significativas entre as espécies bacterianas para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (p < 0,05). Valor p < 0,05 indica diferença significativa entre os valores de IINIB e IINAB pela Análise de Variância (ANOVA), considerando-se espécies bacterianas e acessos.

Na Tabela 4, estão dispostos os dados referentes à presença e a ausência de desinibidores/desestressores bacterianos na atividade antibacteriana de extrato alcoólico de frutos com sementes dos dois acessos de hibisco, independentemente dos fatores tempo de confrontação, considerando espécies bacterianas. Predominantemente os valores de IINIB foram maiores se relacionados aos valores de IINAB. Sendo assim, em grande parte dos experimentos os extratos vegetais apresentaram uma atividade bacteriostática maior do que bactericida. Entretanto, no acesso Palmares do Sul, o valor de IINIB e IINAB de *Escherichia coli* foi igual, e o mesmo ocorreu no acesso Porto Alegre com o valor de *Enterococcus faecalis*. *Escherichia coli* e *Salmonella* Enteritidis no acesso Porto Alegre 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 mostraram-se maiores aos do acesso Porto Alegre, fato que possivelmente pode ser atribuído às 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 foram da espécie bacteriana *Escherichia coli* e, para o acesso Porto Alegre, *Salmonella* Enteritidis. Os valores de IINAB de *Enterococcus faecalis* (acesso Palmares do Sul) e *Staphylococcus aureus* (Porto Alegre) foram zero, considerando que somente houve bacteriostasia e não bactericida (Tabela 4).

Muitos trabalhos têm sido realizados envolvendo a atividade antimicrobiana de plantas, mais especificamente aquelas plantas utilizadas para fins medicinais^{20,29}. Em se tratando de cálices de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.), diversas publicações mostram

que essa planta possui compostos antimicrobianos que inibem o crescimento de micro-organismos^{18,31}. Porém, existem poucos estudos como este mostrando a atividade antimicrobiana de outros componentes vegetais do hibisco.

A quantidade de polifenóis totais e antocianinas do extrato alcoólico de cálices e do extrato alcoólico dos frutos com sementes apresentaram diferença significativa. O extrato alcoólico de cálices apresentou maior quantidade de antocianinas do que o extrato alcoólico de frutos com sementes, como pode ser observado na Tabela 5. Um estudo realizado por Juliani et al.³² 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. Entretanto, neste estudo ocorreu o contrário, onde os frutos com sementes, de coloração verde, apresentaram menor quantidade de polifenóis totais e de antocianinas quando comparados aos cálices vermelhos. A alta concentração de antocianinas e de polifenóis totais nos extratos alcoólicos do hibisco também foi referenciada por outros autores³³, quando relacionaram a alta concentração de antocianinas nos cálices do hibisco com uma boa fonte de antioxidantes, devido à presença de compostos fenólicos.

Em diversas pesquisas, os fenóis e as antocianinas foram extraídos do cálice do hibisco utilizando água³⁴ e metanol³⁵, e poucos estudos como este foram realizados utilizando o etanol como solvente³⁶. As extrações dos compostos antimicrobianos e antioxidantes (antocianinas e polifenóis totais) nas diferentes estruturas do hibisco, neste trabalho, foram realizadas por meio de alcoolatura etanólica. Mohd-Esa et al.³⁷ testaram a atividade antioxidante em diferentes partes do hibisco, comparando

Tabela 5. Teor de polifenóis e antocianinas das diferentes estruturas de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco) confrontado com a atividade antibacteriana exercida pelas diferentes estruturas de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), independentemente 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

Estrutura vegetal	Polifenóis totais (mg GAE.100 g ⁻¹)	Antocianinas (mg.100 g ⁻¹)	Valor p	Atividade antibacteriana*
Cálices	162,1	85,9	p < 0,05	9,1
Frutos com sementes	114,9	3,2	p < 0,05	4,1

*12 a 1 = valores arbitrários que representam a intensidade da atividade antibacteriana (média de 4 repetições); 0 = não atividade.

o extrato metanólico com o aquoso e constatando que o extrato alcoólico, embora metanólico, ofereceu determinação mais realista da atividade antioxidante do que o extrato obtido por meio de água destilada. Nessa mesma pesquisa³⁷, as sementes tiveram um conteúdo de fenóis maior do que qualquer outra estrutura vegetal do hibisco, tanto na extração feita por metanol quanto por água. Esses dados não estão de acordo com o encontrado neste experimento, onde o extrato alcoólico de cálices apresentou uma quantidade maior de polifenóis totais quando comparado ao extrato de frutos com sementes.

Ramos et al.³⁸ avaliaram os fenóis em duas formas de preparo do cálice do hibisco, extrato aquoso e etanólico, e constataram que os valores obtidos foram similares, mostrando que ambos são fonte desses constituintes. A eficácia da ação antioxidante dos componentes bioativos depende da estrutura química e da concentração desses fitoconstituintes, que, por sua vez, é amplamente influenciado por fatores genéticos, adubação e condições ambientais, além do grau de maturação e variedade da planta. A nutrição das plantas é afetada diretamente pela composição do substrato utilizado, pelos níveis de nutrientes disponíveis e conforme a quantidade de adubo adicionado³⁸.

Muitos estudos têm demonstrado que os flavonoides e os compostos polifenólicos extraídos do vinho tinto, do suco de uva e dos chás podem prevenir a aterosclerose em *hamsters*³⁹. Logo, o extrato alcoólico de cálices do hibisco poderia ser utilizado como uma substância alternativa atuando na prevenção de algumas doenças, já que possui uma expressiva quantidade de polifenóis totais.

Em relação ao rendimento médio do acesso Palmares do Sul, para o extrato alcoólico de cálices e extrato alcoólico de frutos com sementes, foi de 32%; já para o acesso Porto Alegre, 27,7% e 30,5% para o extrato alcoólico de cálices e frutos com sementes, respectivamente. O método de extração foi considerado relativamente bom, uma vez que Fiuza et al.⁴⁰, utilizando

o mesmo método de extração, obtiveram rendimento de 25,78% no extrato de pitanga (*Eugenia uniflora* L.).

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

CONCLUSÃO

Constatou-se que nos dois extratos, quanto às espécies bacterianas, ocorreu uma maior atividade bacteriostática do que bactericida, ou seja, os valores de IINIB foram superiores aos de IINAB. Predominantemente, a bactéria mais sensível foi *Salmonella* Enteritidis. Quanto à atividade antibacteriana dos diferentes acessos, os valores arbitrários dos extratos alcoólicos de cálices e de frutos com sementes do hibisco de Palmares do Sul foram superiores quando comparados aos de Porto Alegre.

A atividade antibacteriana, a quantidade de polifenóis totais e de antocianinas do extrato alcoólico de cálices do hibisco apresentaram valores maiores do que o extrato alcoólico de frutos com sementes. Sendo assim, possivelmente existe uma relação direta entre essas variáveis em diferentes estruturas vegetais do hibisco.

AGRADECIMENTO

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

REFERÊNCIAS

1. Forsythe, SJ. Microbiologia da Segurança Alimentar. Porto Alegre (RS): Artmed; 2002. 424 p.
2. Pereira MC, Vilela GR, Costa LMAS, Silva RF, Fernandes AF, Fonseca EWN, et al. Inibição do desenvolvimento fúngico

- através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Ciênc Agrotec*. 2006;30(4):731-8.
3. Souza EL, Lima EO, Narain N. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. *Hig Aliment*. 2003;17(113):38-42.
 4. Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte, MCT, Rehder VLG, et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils aromatic plants used in Brazil. *Braz J Microbiol*. 2004;35:275-80.
 5. Peng Y, Yuan J, Liu F, Ye J. Determination of active components in rosemary by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *J Pharm Biomed Anal*. 2005;39(3-4):431-7.
 6. Lorenzi H, Matos FJA. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. São Paulo (SP): Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2002.
 7. Martins ER, Castro DM, Castellano DC, Dias JE. Plantas medicinais. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa; 1994.
 8. Panizza S. Plantas que curam: cheiro de mato. 2. ed. São Paulo (SP): IBRASA; 1997.
 9. McCaleb RS. Roselle Production Manual (*Hibiscus sabdariffa*). Herb Research Foundation, USA, 1998. [acesso 2009 dez 20]. Disponível em: [http://www.herbs.org/afrika/hibiscus production manual.html].
 10. Castro NEA, Pinto JEBP, Cardoso MG, Morais AR, Bertolucci SKV, Silva FG, et al. Planting time for maximization of yield of vinegar plant calyx (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Ciênc Agrotec*. 2004;28(3):542-51.
 11. Mahadevan N, Shivali, Pradeep K. *Hibiscus sabdariffa* Linn. An overview. *Nat Prod Radiance*. 2009;8(1):77-83.
 12. Liu KS, Tsao SM, Yin MC. In vitro antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. *Phytother Res*. 2005; 19:942-5.
 13. 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 Serv Technol*. 2004;4:141-8.
 14. Wang CJ, Wang JM, Lin WL, Chu CY, Chou FP, Tseng TH. Protective effect of hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. *Food Chem Toxicol*. 2000;38(5):411-16.
 15. Brasil. Ministério da Saúde. Portaria nº 519, de 26 de junho de 1998. Aprova o Regulamento Técnico para Fixação de Identidade e Qualidade de "Chás - Plantas Destinadas à Preparação de Infusões ou Decocções". Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 29 jun 1998.
 16. Vilche C, Gely M, Santalla E. Physical properties of quinoa seeds. *Biosyst Eng*. 2003;86(1):59-65.
 17. Morton JF. Roselle. In: Morton JF. Fruits of warm climates. Miami, FL: Florida Fair Books, 1987, p. 281-6.
 18. Chao CY, Yin MC. Antibacterial effects of Roselle Calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. *Foodborn Pathog Dis*. 2009;6(2):201-6.
 19. Akindahunsi AA, Olaleye MT. Toxicological investigation of aqueous-methanolic extract of the calyces of *Hibiscus sabdariffa* L. *J Ethnopharmacol*. 2003;89:161-4.
 20. Avancini CAM, Wiest JM. Atividade desinfetante do decocto de *Hypericum caprifoliatum* Cham. *Eshclecht*. *Guttiferae* ("escadinha/sinapismo") frente a diferentes doses infectantes de *Staphylococcus aureus* (agente infeccioso em mastite bovina). *Rev Bras Plantas Med*. 2008;10(1):64-9.
 21. Romeiro RS. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. Laboratório de Bacteriologia de Plantas. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa. [acesso 2009 abr 05]. Disponível em: [http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf].
 22. Cavalli-Sforza L. *Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistic (Biometria: fundamentos de estatística viológica-médica)*. Stuttgart: Gustav Fisher, 1974. p. 201-4.
 23. Deutsche Veterinärmedizinische Gesellschaft (DVG)/ Sociedade Alemã de Medicina Veterinária. Richtlinien zur Prüfung chemischer Desinfektionsmittel für die Veterinärmedizin/ Normas para a testagem de desinfetantes químicos para a medicina veterinária. Giessen, 1980. In: Schliesser Th, Strauch D. *Desinfektion in Tierhaltung, Fleisch- und Milchwirtschaft/ Desinfecção na produção animal, em laticínios e em frigoríficos*. Stuttgart: Enke Verlag, 1981.
 24. Callegari-Jacques SM. *Bioestatística: princípios e aplicações*. Porto Alegre (RS): Artmed; 2003.
 25. Vinson JA, Su X, Zubik L, Bose P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. *J Agric Food Chem*. 2001;49(11):5315-21.
 26. Karou D, Dicko MH, Simporé J, Traore AS. Antioxidant and antibacterial activities of polyphenols from ethnomedicinal plants of Burkina Faso. *Afr J Biotechnol*. 2005;4(8):823-8.
 27. Kuskoski EM, Asuero AG, Morales MT, Fett R. Frutas Tropicais Silvestres e Polpas de Frutas Congeladas: Atividade Antioxidante, Polifenóis e Antocianinas. *Ciênc Rural*. 2006;36(4):1283-7.
 28. Teixeira L, Stringheta PC, Oliveira FA. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Rev Ceres*. 2008;4(55):297-304.
 29. Carvalho HHC, Cruz FT, Wiest JM. Atividade antibacteriana em plantas com indicativo etnográfico condimentar em Porto Alegre, RS/Brasil. *Rev Bras Plantas Med*. 2005;7(3):25-32.
 30. Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim Nova*. 2007;30(2):374-81.
 31. Olaleye MT. Cytotoxicity and antibacterial activity of Methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. *J Med Plant Res*. 2007;1(1):9-13.
 32. Juliani HR, Welch CR, Wu Q, Diouf B, Malainy D, Simon JE. Chemistry and Quality of Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for Developing the Natural-Product Industry in Senegal. *J Food Sci*. 2009;74(2):113-21.
 33. Sáyago-Ayerdi SG, Arranz S, Serrano J, Goñi I. Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in Roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage. *J Agric Food Chem*. 2007;55(19):7886-90.
 34. Tsai PJ, McIntosh J, Pearce P, Camden B, Jordan BR. Anthocyanin and antioxidant capacity in Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.) extract. *Food Res Int*. 2002;35:351-6.
 35. Fullerton M, Khatiwada J, Johnson JU, Davis S, Williams LL. Determination of antimicrobial activity of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) on *Esherichia coli* O157:H7 isolated from food, veterinary, and clinical samples. *J Med Food*. 2011;14(9):950-6.
 36. Yang L, Gou Y, Zhao T, Zhao J, Li F, Zhang B, et al. Antioxidant capacity of extracts from calyx fruits of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). *Afr J Biotechnol*. 2012;11(17): 4063-8.

37. Mohd-Esa N, Hern FS, Ismail A, Yee CL. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. *Food Chem*. 2010;122:1055-60.
38. Ramos DD, Vieira MC, Formagio ASN, Cardoso CAL, Ramos DD, Carnevali TO. Atividade antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica. *Ciênc Rural*. 2011;41(1):1331-6.
39. Vinson JA, Teufel K, Wu N. Red wine, dealcoholized red wine, and especially grape juice, inhibit atherosclerosis in a hamster model. *Atherosclerosis*. 2001;156:67-72.
40. Fiuza TS, Silva PC, Paula JR, Tresvezol LMF, Souto MED, Sabóia-Morais SMT. Análise tecidual e celular das brânquias de *Oreochromis niloticus* L. tratadas com extrato etanólico bruto e frações das folhas da pitanga (*Eugenia uniflora* L.) – Myrtaceae. *Rev Bras Planta Med*. 2011;13(4):389-95.