



Avaliação da atividade antimicrobiana sobre a ação do extrato da flor do hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L.)

Caroline de Nazaré dos Santos da Silva¹, Janaina da Costa Nogueira², Adriana Dantas Gonzaga de Freitas³

Resumo

Hibiscus rosa-sinensis L. é uma planta há tempos utilizada como alimento funcional e na medicina tradicional, é utilizada na fabricação de chás pois auxiliam no processo de emagrecimento, possuem ação anti-inflamatória, atuam na redução do colesterol e apresentam potente ação antibacteriana. Nos últimos anos, o interesse por produtos derivados de plantas medicinais que apresentem compostos bioativos tem sido intensificado. O presente trabalho buscou avaliar a ação antibacteriana de extratos metanólicos bruto de *Hibiscus rosa-sinensis* L. frente a diferentes bactérias Gram-positivas e Gram negativas como *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* e *Enterococcus faecalis*. Para a realização do experimento, folhas de *Hibiscus rosa-sinensis* foram coletadas em uma área da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), e submetidas à secagem e posteriormente a diferentes processos de extração em solvente metanólico dos seus compostos orgânicos por meio dos métodos de Soxhlet, Ultrassom e Estático. Os rendimentos obtidos ao final de cada extração foram de 8,9 g; 8,3 g e 8,2 g respectivamente. Com relação à atividade antimicrobiana foi observado que os diferentes extratos obtidos pelo Soxhlet, Ultrassom e Estático apresentaram atividade antibacteriana frente à bactéria *Bacillus subtilis* apresentando halos de inibição de tamanhos 9 mm; 13,5 mm e 20,6 mm, respectivamente. Posteriormente, foram realizadas análises do extrato ativo em Cromatografia de Camada Delgada (CCD) e Espectrometria de Massas (MS) para melhor compreensão química dos seus compostos.

Palavras-chave: *Hibiscus rosa-sinensis*, extratos orgânicos, atividade antibacteriana.

Evaluation of antimicrobial activity on the action of hibiscus flower extract (*Hibiscus rosa-sinensis* L.). *Hibiscus rosa-sinensis* L. is a plant that has long been used as a functional food and in traditional medicine, it is used in the manufacture of teas because they aid in the weight loss process, have anti-inflammatory action, act in the reduction of cholesterol and have a potent antibacterial action. In recent years, interest in products derived from medicinal plants that contain bioactive compounds has intensified. The present work seeks to evaluate the antibacterial action of crude methanolic extracts of *Hibiscus rosa-sinensis* L. against different Gram-positive and Gram-negative bacteria such as *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Enterococcus faecalis*. For the experiment, leaves of *Hibiscus rosa-sinensis* were collected in an area of the Federal University of Amazonas (UFAM), and subjected to drying and later to different processes of methanolic solvent extraction of its organic compounds using Soxhlet methods, Ultrasound and Static.

¹ Graduanda Ciências Naturais UFAM Manaus, Amazonas Brasil, caroline_silva_001@hotmail.com

² Profa colaboradora UFAM, Manaus, Amazonas Brasil. jana-nogueira@hotmail.com

³ Profa: ICB/UFAM, Depto Morfologia, Manaus, Amazonas Brasil. adrianadantas1@gmail.com;



The yields obtained at the end of each extraction were 8.9 g, 8.3 g and 8.2 g respectively. Regarding antimicrobial activity, it was observed that the different extracts obtained by Soxhlet, Ultrasound and Static showed antibacterial activity against the bacterium *Bacillus subtilis* with inhibition halos of sizes 9 mm; 13.5 mm and 20.6 mm, respectively. Subsequently, analyzes of the active extract were performed in Thin Layer Chromatography (TLC) and Mass Spectrometry (MS) for better chemical understanding of its compounds.

Keywords: Hibiscus, organic extracts, activity antibacterial.

1. Introdução

De acordo com Lorenzi (2002) a família Malvaceae se constitui de ervas, subarbustos, arbustos, lianas e árvores de pequeno e grande porte representada por 250 gêneros e 4200 espécies aproximadamente distribuídas em regiões temperadas, onde no Brasil, consiste 80 gêneros e 400 espécies. Além disso, apresentam tecidos nectaríferos constituídos de tricomas glandulares situados internamente na base do cálice ou menos comumente nas pétalas ou no androginóforo (Silva, 2014).

O *Hibiscus rosa-sinensis* L. pertence à família das malváceas, têm um caule vermelhado, seu arbusto varia entre 2 a 3 metros de altura, ramificado, seu ciclo de vida varia de 180 a 320 dias, (Lorenzi, 2002; Silva et al., 2019). Seu cálice é verde e sua corola vermelha, além disso, possui nomes populares como mimo-de-vênus, hibisco-da-china, Rosa-da-China e Papola, na região amazônica do Brasil, é considerado como uma planta exótica, é também designado como amor-de-homens, aurora ou Pampulha. É um arbusto híbrido que se cultiva em sol absoluto, e seu cultivo se dá através de estacas caulinares.

Suas folhas apresentam a existência de esteróis, ácidos gordos, alcaloides, açúcares redutores, glicosídeos, resinas e ácido málvico. Já em suas flores encontram-se ácido cítrico, ascórbico e oxálico e flavonoides. No seu caule existem ácidos málvicos bem como nas folhas e nas raízes: aminoácidos, taninos, proteínas e glicosídeos também são presentes (Pekamwar et al., 2013).

Não se sabe a verdadeira nacionalidade do *Hibiscus rosa-sinensis* L. mas de acordo com Silva et al., 2016, seu nome leva a crer que é originário da China ou da Índia, ademais há relatos que já era cultivado na Espanha.

A utilização do *Hibiscus rosa-sinensis* L. como alimento funcional é uma excelente medida preventiva visto que vários compostos funcionais são encontrados nessa planta, comprovando sua atribuição como um alimento benéfico. A planta é abundante em vitamina C, substâncias bioativas como antioxidantes solúveis em água, antocianinas, flavonoides, ácidos fenólicos, betacaroteno entre outros compostos (Ramos, 2006).

O extrato aquoso de hibisco apresenta altos teores de taninos e antocianinas além de apresentar alto teor reduzindo o poder antioxidante, podendo trazer benefícios contra os danos oxidativos decorrentes do acúmulo de radicais livres em nosso organismo. A atividade antimicrobiana desses extratos aquosos e também de extratos etanólicos, apresentam ação inibidora de crescimento de patógenos de origem alimentar como *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus* (Maky. et. al., 2013).

As flores de hibisco são muito utilizadas na medicina tradicional para os males da hipertensão, inflamação e na prevenção do câncer (Rocha, 2014). O tratamento termal dos seus cálices desidratados, produzem uma bebida que serve como tratamento diabético. Nos últimos anos, a aparição de novas doenças e o crescimento considerável de outras fez com que houvesse uma expansão nas



pesquisas em extratos de plantas medicinais como o Hibisco com relação ao desempenho contra microrganismos (Rocha, 2014).

A ação antimicrobiana de extratos vegetais é analisada através da determinação de uma pequena quantidade da substância necessária para impedir o crescimento do microrganismo teste; esse valor é conhecido como Concentração Mínima Inibitória (CMI). Um aspecto bastante significativo na determinação da CMI de extratos vegetais é a preocupação em relação aos aspectos toxicológicos, microbiológicos pertinentes aos compostos naturais ou suas combinações (Pinto et al., 2003).

As substâncias naturais, de origem vegetal, tornam o alimento mais chamativo ao consumidor, além de aumentar a vida útil pela capacidade bacteriostática e bactericida, retardando o começo da deterioração e o crescimento de microrganismos indesejáveis (Pereira et al., 2006). O controle de microrganismos multiresistentes às vezes é ineficaz mesmo com o desenvolvimento de novos antibióticos. Múltiplos extratos dessas plantas apresentam efeitos antimicrobianos o que pode representar uma alternativa terapêutica para doenças infecciosas, sobretudo quando associados aos antibióticos de uso clínico.

Desta forma, este trabalho teve como objetivo coletar a planta de *Hibiscus rosa-sinensis* L. para obter seu extrato metanólico bruto e assim, realizar a investigação de atividade microbiana dos extratos de Hibisco (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) frente às cepas bacterianas *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Área de estudo

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia da Universidade Federal do Amazonas,

localizado no Instituto de Ciências Biológicas ICB 01, Departamento de Morfologia.

2.2 Obtenção e processamento do material vegetal

O material vegetal consistiu das flores de *Hibiscus rosa-sinensis* L. *in natura* que foram coletadas no setor sul da Universidade Federal do Amazonas (3°05'28" Sul e 59°57'57" Oeste), e levadas ao laboratório de Pesquisa em Microbiologia. As amostras foram acondicionadas e posteriormente identificadas por meio de registro no herbário da Universidade Federal do Amazonas e armazenadas pela primeira vez.

As flores foram selecionadas e coletadas 3 vezes nos períodos de Agosto e Setembro de 2018, com auxílio de uma tesoura e um podão, onde foram armazenadas em sacos de papel e identificadas. Posteriormente foram pesadas e mantidas em estufa de circulação de ar a uma temperatura constante de 55°C, por um período de 3 dias. Após o período de secagem, as folhas foram maceradas através de um pistilo e cadinho até a obtenção de 200 g de material vegetal triturado.

2.3 Extração dos compostos orgânicos

O material vegetal triturado foi encaminhado ao laboratório de Produtos Naturais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas onde foram obtidos os extratos líquidos concentrados através do sistema fechado do tipo Soxhlet, ao Laboratório Central de Análises e Biorgânica (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais da ESA-UEA) para o método por Ultrassom e Laboratório de Pesquisa em Microbiologia (ICB 1- Mini Campus, UFAM) para o método do Estático utilizando 500 ml do líquido extrator álcool metílico P.A 99,5% para cada 50 g de material vegetal seco e posteriormente as amostras foram concentradas em um evaporador rotatório.



Ao final do processo de extração foi utilizado o Dimetilsulfóxido (DMSO) para resuspender o extrato final bruto, assim reconstituindo-se as concentrações iniciais dos componentes. O extrato final foi armazenado sob refrigeração para análise posterior da atividade microbiana frente a microrganismos teste.

2.4 Microrganismos testes

Foram utilizadas 4 cepas bacterianas de padrões internacionais (ATCC–American Type Culture Collection) pertencentes ao Laboratório de pesquisa em Microbiologia: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Bacillus subtilis* (cepa cedida pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos do Instituto de Pesquisa da Amazônia) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

As cepas utilizadas foram primeiramente reativadas em Caldo Miller Hilton e após o crescimento, as colônias isoladas foram inoculadas em meio Caldo Miller Hilton por 24h à temperatura de 35°C. Após este período, as culturas foram transferidas para solução salina (NaCl 0,9%; p/v) até obter uma turvação equivalente ao padrão 0,5 da escala de MacFarland, correspondendo a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ Unidades Formadoras de Colônia/ml (UFCs/ml). Uma alíquota de 100µL da suspensão de cada microrganismo teste foi semeada em placas de Petri contendo meios de cultura específico (Shadomy, 1980).

2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana de *H. rosa-sinensis* L.

Para a avaliação da atividade antibacteriana, discos de papel filtro autoclavados, foram impregnados com 10µl do extrato metanólico de *H. rosa-sinensis* L. e posicionados sobre placas semeadas com os microrganismos teste, mantendo-se uma distância de 30 mm entre os discos para evitar interferências entre os possíveis halos de inibição, tendo como controle negativo, discos de papel

impregnados com Dimetilsulfóxido (DMSO) e para o controle positivo foram utilizados 50µg/ml do antibiótico ampicilina. As placas foram incubadas a 35°C por 24-48 horas, para visualização dos halos de inibição formados, em resposta à difusão dos possíveis compostos antibacterianos contidos no extrato bruto para o meio de cultura.

A leitura dos resultados consistiu na medida do diâmetro dos halos de inibição (em mm) por meio de um paquímetro, formados ao redor do disco de papel. Os bioensaios foram realizados em triplicata.

2.6 Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

Foi realizada uma avaliação em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) onde foram dissolvidos 0,010g em 1 ml de solvente álcool etílico de extratos obtidos por meio do Soxhlet, Ultrassom e Estático de *Hibiscus rosa-sinensis* L. e aplicados com auxílio de um capilar em uma placa de sílica de tamanho 5cm x 10cm. Foi utilizado uma proporção de 10 ml de Hexano como solvente durante a primeira fase. Em seguida, o solvente foi trocado por 8 ml de Hexano+ 2ml de acetato de etila, e na última etapa foi trocado por solvente TAM (10 ml de Tolueno, Acetona e MeOH na proporção 5:3:2).

Em seguida, foi utilizado uma segunda placa de sílica e aplicado novamente a mesma quantia de extratos do processo anterior. Foi aplicado o solvente TEF (10 ml de Tolueno, Acetato e Ácido Fórmico na proporção 5:4:1). Ao final, foi levado ao revelador físico (luz UV) vista a 240 nm para que ficasse visível durante a corrida dos reagentes.

2.7 Espectrometria de massas (MS)

Foi feita a espectrometria de massas com os extratos de *Hibiscus rosa-sinensis* L. os quais foram pesados 0,010 g e adicionados 1ml de metanol e aplicados por meio de injeção líquida na máquina



Thermo Scientific para leitura das moléculas das amostras e separadas no espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa (m) sobre a carga (z), m/z.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Material vegetal e processo de extração

A planta foi coletada, identificada e armazenada pelo Herbário da UFAM, onde foi registrada como nº1 Malvaceae CNSSilva em 03/04/2018. Para cada método de extração dos compostos orgânicos presentes no material vegetal, foram selecionados 50 g de *Hibiscus rosa-sinensis* L., ao final das extrações por Soxhlet, Ultrassom e Estático foram obtidos os rendimentos de 8,9 g; 8,3 g e 8,2g, respectivamente.

3.2 Avaliação da atividade antibacteriana

Foi realizada uma triagem da atividade antibacteriana dos extratos obtidos, onde verificamos a ausência do aparecimento de halo para as bactérias *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* nos três métodos de extratos utilizados. Entretanto, houve aparecimento de halos para a cepa *Bacillus subtilis*, apresentando halos nos três extratos. Indicando assim, atividade antibacteriana frente a esta cepa.

Resultado parecido pode ser observado nos estudos de Olaleye et al., (2017), Chao & Yin (2009) e Rengarajan et. al. (2016) onde a espécie *Hibiscus rosa-sinensis* L. também não apresentaram atividade significativa frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, que também foram avaliadas nesse estudo. Vijayakumar et al. (2018) que executou teste antibacteriano frente ao extrato metanólico de *Hibiscus rosa-sinensis* L. apresentou também resultado significativo frente a cepa de *Bacillus subtilis*.

Por fim, foi feita a medição dos halos de cada placa e calculado suas médias

de cada extrato das cepas *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*, no qual obtiveram o halo de 9mm para extração realizada no sistema soxhlet; 13,5 mm para a extração realizada no sistema de ultrassom e 20,6mm para extração realizada no sistema estatico.

Os extratos que apresentaram ausência de atividades antimicrobianas podem ser ao fato de que as cepas de *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus* podem apresentar resistência devido a concentração dos extratos ou bem como o solvente não ser o adequado para a extração dos compostos que levem a inibição de crescimento destas bactérias. Além disso, de acordo com Silva et.al. (2019) há vários fatores que influenciam na atividade das plantas medicinais, assim, ocasionando alterações nos teores dos compostos, como: temperatura, altitude, poluição atmosférica, tipos de solventes utilizados na extração e outros.

Observamos um exemplo disto comparando com o trabalho de Silva et al. (2014) onde, diferente desta pesquisa, as flores desta mesma espécie foram coletadas na região de Porto Alegre- Rio Grande do Sul, seu extrato foi feito com solvente etanol e apresentou atividade frente à cepa *S. aureus*.

3.3 Avaliação dos compostos orgânicos em cromatografia de camada delgada (CCD)

Foi realizada uma avaliação em Cromatografia em Camada Delgada (CCD) do extrato que apresentou atividade positiva frente a *B. subtilis*. como em Rengarajan et al. (2016). Apresentando o resultado da sua fase estacionária com Fator de Retenção (Rf) 0.48. As placas de CCD mostraram indícios de compostos químicos presentes.

Na segunda placa, utilizou-se os mesmos valores do extrato do processo anterior, entretanto, utilizando o solvente



TEF (10 ml de Tolueno, Acetato e Ácido Fórmico na proporção 5:4:1) onde apresentou resultado com Fator de Redenção (rf) 0.22.

Ao final, foi levado ao revelador físico onde se obteve valores ideais parecidos com Rengarajan et al. (2016) de (rf) onde apresentou 0.44 e 0.27.

3.4 Espectrometria de massas dos extratos de *Hibiscus rosa-sinensis* L.

Foi realizada a espectrometria de massas onde os extratos de *Hibiscus rosa-sinensis* L. solubilizados em metanol apresentaram valores abundantes de massas como 62,5; 59,6; 71,5; 79,6. Apresentando, assim como Figueiredo (2018) durante seu teste de espectrometria das folhas de Mastruz extraídas também em metanol, variedades de compostos químicos. Além disso, possivelmente podem apresentar valores em comum com o espectro de *Hibiscus rosa-sinensis* L. como em Figueiredo, que apresenta uma massa no valor de 362.40 e no espectro deste trabalho, apresenta uma de valor 360.3, desta forma, tendo a possibilidade de haver um composto próximo entre eles.

Ademais, podemos analisar que no estudo feito por Maciel et al. (2018) foi detectado uma massa de valor 449, sendo representado por Cianidina-3-O-glucósido. Neste presente trabalho, há uma massa no valor de 447 podendo apresentar semelhança com esta molécula química, podendo estar na classificação das cianidinas.

4. Referências

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

FIGUEIREDO, R.C.; ROCHA, W.C.; FREITAS, A.D.G. Efeito Inseticida do Óleo Essencial e Extratos Etanólicos das Folhas de Mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) Sobre o Gorgulho do Milho (*Sitophilus zeamais* Mots). *Ensaio Cienc.*, v.22, n.2, p.80-84, 2018.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum, p. 511, 2002.

MACIEL, L.G., DO CARMO, M.A.V., AZEVEDO, L., DAGUER, H., Molognoni, L., de Almeida, M.M., Granato, D., and Rosso, N.D.. 2018. Hibiscus sabdariffa anthocyanins-rich extract: chemical stability, in vitro antioxidant and antiproliferative activities. *Food and Chemical Toxicology*, 113: 187-197.

MAK, Y. W.; CHUAH, L. O.; AHMAD, R.; BHAT, R. Antioxidant and antibacterial activities of hibiscus (*Hibiscus rosa-sinensis* L.) and Cassia (*Senna icapsularis* L.) flower extracts. *Journal of King Saud University- Science*. V.25, p.275-282, 2013.

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.

PEKAMWAR, S.S.; KALYANKAR, T.M.; JADHAV, A.C. *Hibiscus rosa-sinensis*: A review on ornamental plant. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.2, n.6, p. 4719-27, 2013.

PEREIRA, M.C.; VILELA, G.R.; COSTA, L.M.A.S.; SILVA, R.F. da; FERNANDES, A.F.; FONSECA, E.W.N. da; PICCOLI, R.H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Ciência e Agrotecnologia*, v.30, n.4, p.731-738, 2006.

PINTO T.J.A.; KANEKO T.M.; OHARA M.T. Controle Biológico de Qualidade de Produtos Farmacêuticos, Correlatos e Cosméticos. 2.ed. São Paulo: Atheneu Editora, p. 325 ,2003.

RAMOS, D. D.; VIEIRA, M.C.; FORMAGIO, A.S.N.; CARDOSO, C.A.L.; RAMOS, D.D.; CARNEVALI, T.O. Atividade antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica. *Revista Ciência Rural*, v.41, n.8, 2006.

RENGARAJAN, S.; MELANATHURU, V.; MUNUSWAMY, D.; SUNDARAM, S.; SELVARAJ, S.T. A comparative study of *in vitro* antimicrobial activity and tlc studies of petals of selected indian medicinal plants. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*. V. 9, 2016.

ROCHA, I.D.C.; BONNLAENDER, B.; SIEVERS, H.; PISCHEL, I.; HEINRICH, M. *Hibiscus sabdariffa* L. - A phytochemical and pharmacological review. *Food Chemistry*, v. 165, p. 424-443, 2014.

SHADOMY, S.; INGROF, A.S. Susceptibility testing: with antifungal drugs. In: LENNETTE, E. Manual of



clinical of microbiology. 3. Ed. Washington: American Society for Microbiology, Cap.62, p.647-653., 1980.

SILVA, A.B. Caracterização antibacteriana, química e fitoquímica de flores de *Hibiscus rosa-sinensis* L. (mimo-de-vênus) e *Hibiscus syriacus* L. (hibisco-da-síria) como fonte de alimento. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos (PPGCTA). Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS). Porto Alegre, 2014.

SILVA, A. B.; WIEST, J. M., CARVALHO, H. H. C.; Compostos químicos e atividade antioxidante analisados em *Hibiscus rosa-sinensis* L. (mimo-de-vênus) e *Hibiscus syriacus* L. (hibisco-da-síria). Brazilian Journal of Food Technology. V.19, e.2015074, Campinas, 2016.

SILVA, N. L.; VIANA, F. C.; ALVES, L. F.; SANTOS, E. C. S.; ANDRADE, L. R.; MORAIS, M. G.; SANTOS,

A. C.; AMARO, S. H. Avaliação da atividade antioxidante e antibacteriana do extrato da flor de *Hibiscus Sabdariffa* e *Hibiscus Rosa-Sinensis*. Conexão Ci. Formiga- Mato Grosso, 2019. V. 14, n. 1, p.14-20.

SPELLBERG, B.; BARTLETT, J.G.; GILBERT, D.N. The future of antibiotics and resistance. The New England journal of medicine. v. 368, n. 4, p. 299-302, 2013.

VIJAYAKUMARA S.; Morvin YABESHA J.E.; ARULMOZHIA P.; PRASEETHAB P.K. Identification and isolation of antimicrobial compounds from the flower

extract of *Hibiscus rosa-sinensis* L: In silico and in vitro approaches. *Microbial Pathogenesis*. V.123, p. 527-535, 2018.