

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS *de Hibiscus sabdariffa*
L. COMO ADITIVO ALIMENTAR EM CARNE MOÍDA BOVINA**

MARCELO PINTO PAIM

PORTO ALEGRE

2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE *Hibiscus
sabdariffa* L. COMO ADITIVO ALIMENTAR EM CARNE MOÍDA BOVINA**

Autor: Marcelo Pinto Paim

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de doutor em Ciências veterinárias na especialidade Inspeção de produtos de origem animal e tecnologia

Orientador: César Augusto
Marchionatti Avancini

PORTO ALEGRE

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Pinto Paim, Marcelo
CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS de
Hibiscus sabdariffa L. COMO ADITIVO ALIMENTAR EM
CARNE MOÍDA BOVINA / Marcelo Pinto Paim. -- 2015.
107 f.

Orientador: César Augusto Marchionatti Avancini.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Veterinária, Programa de
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Porto Alegre,
BR-RS, 2015.

1. Hibiscus sabdariffa L.. 2. Aditivo alimentar
em carne moída bovina. 3. Atividade antibacteriana e
antioxidante. 4. Análises físico-químicas, fitoquímicas
e minerais. 5. Extratos etanólicos e hidroetanólicos.
I. Marchionatti Avancini, César Augusto, orient. II.
Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Marcelo Pinto Paim

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE *Hibiscus sabdariffa*
L. COMO ADITIVO ALIMENTAR EM CARNE MOÍDA BOVINA**

Aprovada em 23 MAIO 2015

Prof. Dr. César Augusto Marchionatti Avancini
Orientador e Presidente da Comissão

Prof. Dr. Eduardo Miranda Ethur
Membro da comissão

Profa. Dra. Ingrid Bergman Inchausti de Barros
Membro da comissão

Prof. Dr. Guiomar Pedro Bergmann
Membro da comissão

Aos meus pais Salatiel e Tânia.

“O Sucesso É ser Feliz

*Quando você nasceu, Deus não rogou uma praga para você ser tímido,
distráido ou confuso.
Ele lhe proporcionou todas as ferramentas
Para você completar Sua criação.*

*Perguntado sobre como era criar uma obra de arte,
Michelângelo respondeu:*

*‘Dentro da pedra já existe uma obra de arte.
Eu apenas tiro o excesso de mármore!’*

Nós somos artistas da nossa criação!

A grande verdade é que você é a pessoa que escolhe ser.

*Todos os dias você decide se continua do jeito que é ou muda.
A grande glória do ser humano é poder participar de sua autocriação.*

O Sucesso É Ser Feliz!”

Roberto Shinyashiki

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus por ter permitido que eu chegasse até o fim desta caminhada, me ajudando a perseverar com força e sabedoria na busca de objetivos.

Aos meus Professores e amigos, Prof. Dr. César A. M. Avancini, pela acolhida e orientação, ao Prof. Dr. José M. Wiest, pela oportunidade de aprendizado, a Prof.^a Dr.^a Ingrid B. I. de Barros e ao Prof. Dr. Guiomar P. Bergmann, pela amizade, auxílio e oportunidade de crescimento profissional e pessoal em vários momentos.

Aos colegas de trabalho dos vários Laboratórios. Em especial Analú da Silva, Elísio José, Heloísa Carvalho, Mônica J. Maciel, Paula Mangoba, Roberval (Rober) e Simone Weschenfelder pelos vários momentos de companheirismo e distração ao longo dos anos.

A minha família, Camila, Salatiel, Tânia, Willian, Camila, Luciana e vovó Manoela que estiveram sempre ao meu lado, apoiando minhas decisões e fazendo planos para o futuro. Peças fundamentais que colaboraram imensamente com a minha chegada até aqui.

A todos e a todas que de alguma forma contribuíram, o *Meu Muito Obrigado*.

RESUMO

Na procura por alimentos saudáveis, nutritivos, com tempo de prateleira aceitável, ganham destaque os aditivos alimentares de origem vegetal que possam atuar na ação conservante dos alimentos. Nesse contexto, o *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), provavelmente de origem africana, também cultivado na Índia e partes da Ásia e América pode servir á esses propósitos. Os extratos obtidos dos cálices desta planta são conhecidos por conter constituintes fitoquímicos que contribuem com atividade antioxidante, assim como para o enriquecimento de sua composição centesimal. O objetivo deste trabalho foi a caracterização fitoquímica, físico-química e mineral de extratos do hibisco, a verificação da atividade antimicrobiana, simular sua aplicação tecnológica em alimento/modelo cárneo buscando-se demonstrar, outrossim, a possibilidade de alternativa para agregar valor e segurança sanitária a produtos cárneos na óptica da agricultura/agroindústria familiar. Para as análises fitoquímicas, utilizaram-se como amostras os cálices frescos, secos e seus respectivos extratos etanólicos e hidroetanólicos. Foram realizadas as seguintes análises: polifenóis totais realizado através do método Folin-Ciocalteu, antocianinas determinadas pelo método de pH diferencial, atividade antioxidante avaliada pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazil) e a caracterização do conteúdo de minerais, determinados pelo método espectroscópico de emissão plasma indutivamente acoplado (ICP), expressos em P, K, Ca, Mg, S, Cu, Zn, Fe, Mn e B. Na caracterização físico-química, foram determinados parâmetros como: lipídios, cinzas, umidade e umidade residual, proteínas, fibra bruta total e carboidratos totais. Assim como caracterizados, os extratos, quanto ao pH e acidez total titulável. Para avaliação antimicrobiana de carne moída bovina acrescida dos extratos nas concentrações de 100% e 50% na composição dos tratamentos simulando o estudo de vida útil através da observação de pH e contagem de microrganismos mesófilos aeróbios. Na determinação da atividade antibacteriana, realizou-se a avaliação *in vitro*, tendo o Teste de Diluição desenvolvido a partir da técnica do sistema de tubos múltiplos, frente aos patógenos bacterianos padrões *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Esses delineamentos de investigação foram elaborados com diferentes concentrações dos extratos vegetais e posteriormente contaminados com os inóculos preparados nas densidades populacionais de 10^4 a 10^8 UFC.mL⁻¹. A atividade antioxidante apresentou os valores máximos de inibição para ambos extratos no tempo total de observação (60 min). Os teores de compostos minerais que se destacaram foram K, Ca e Mn. Em relação a composição físico-química dos cálices secos destacaram-se principalmente os valores de proteína, fibra bruta total, carboidratos totais e baixos valores de lipídios. Dados obtidos *in vitro*, apontaram o efeito antibacteriano marcadamente homogêneo com relação a concentrações e os tempos de contato, assim como, a redução das densidades populacionais bacterianas em ambos confrontos. Foi observado o declínio de pH e estabilidade na multiplicação dos microrganismos mesófilos aeróbios. Como considerações, este estudo sugere que o hibisco tem o potencial para ser utilizado em alimentos como fonte de compostos fitoquímicos, minerais e ação antioxidante. Nos extratos etanólico e hidroetanólico os baixos valores de pH e as quantidades de ácido cítrico sugerem a utilização em sistemas alimentares com vistas a conservação. Salienta-se a utilização dos extratos de hibisco como aditivo em produto cárneo, por seu efeito antibacteriano.

Palavras-chave: *Hibiscus sabdariffa* L., características físico-químicas, Compostos fitoquímicos e minerais, atividade antioxidante, Atividade antibacteriana, aditivo cárneo.

ABSTRACT

In the search for healthy, nutritious foods, with time acceptable shelf, are highlighted food additives of plant origin that can act in the preservative action of food. In this context, the *Hibiscus sabdariffa* L. (hibiscus), probably of African origin, also cultivated in India and parts of Asia and America can serve you these purposes. The extracts obtained from the chalice of this plant are known to contain phytochemical constituents that contribute to antioxidant activity, as well as to enrich their chemical composition. The objective of this study was to characterize phytochemical, physico-chemical and mineral hibiscus extracts, verifying the antimicrobial activity, simulate its technological application in food / meat model seeking to demonstrate, instead, the ability to maximize the value and safety health to meat products from the perspective of agriculture / agribusiness family. For phytochemical analysis, were used as samples cups fresh, dried and their ethanolic and hydroethanolic extract. The following analysis were performed: total polyphenols performed by the Folin-Ciocalteu method, pH anthocyanins determined by the differential method, the antioxidant activity was evaluated by the method of DPPH (2,2-diphenyl-1-picrihidrazil) and characterizing the mineral content, determined by the spectroscopic method of inductively coupled plasma emission (ICP), expressed as P, K, Ca, Mg, S, Cu, Zn, Fe, Mn and B. The physico-chemical characterization, were determined parameters such as lipids, ash, moisture and residual moisture, protein, fiber and total gross total carbohydrates. As characterized, the extracts for pH and titratable acidity. For antimicrobial evaluation of bovine ground meat plus the extracts in concentrations of 100 % and 50 % in the composition of treatments simulating the lifetime of study by observing pH and counting of mesophilic aerobic microorganisms. In determining the antibacterial activity was held to evaluate in vitro, with the Dilution Test developed from the multiple tube system technique, compared with standard bacterial pathogens *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. These research designs were prepared with different concentrations of plant extracts and subsequently infected with the inoculum prepared at densities 10^4 - 10^8 UFC.mL⁻¹. The antioxidant activity showed the maximum values of inhibition for both extracts in total observation time (60 min). The mineral compounds that stood out were K, Ca and Mn. Regarding the physical and chemical composition of dry chalice mainly stressed up the protein values, gross fiber, total carbohydrates and low lipid values. Data obtained in vitro, the antibacterial effect showed markedly homogeneous with respect to concentrations and contact times, as well as the reduction of bacterial population densities both clashes. The decline of pH and stability in the multiplication of mesophilic aerobic microorganisms was observed. As considerations, this study suggests that hibiscus has the potential to be used in foods as a source of phytochemicals compounds, minerals and antioxidant. In hydroethanolic and ethanolic extracts the low pH values and the amounts of citric acid suggested for use in food systems with a view to maintenance. It should be noted the use of hibiscus extract as an additive in a meat product, for their antibacterial effects.

Key words: *Hibiscus sabdariffa* L., physical and chemical characteristics, phytochemicals and minerals compounds, antioxidant activity, antibacterial activity, flesh additive.

LISTA DE QUADRO - ARTIGO 3

Quadro 1	Representação dos valores ordinais arbitrários de intensidade de atividade atribuídos às variáveis da Atividade Antibacteriana e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos.....	83
----------	---	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dose diária recomendada de minerais.....	36
Tabela 2	Graus de acidez de diversos tipos de alimentos.....	37
Tabela 3	Limites de multiplicação microbiana referentes ao pH.....	38
Tabela 4	Limites microbiológicos sugeridos para vida de prateleira.....	40

LISTA DE TABELAS - ARTIGO 1

Tabela 1	Determinação dos índices de polifenóis totais e antocianinas presentes nos extratos etanólicos e hidroetanólicos de <i>Hibiscus Sabdariffa</i> L.	51
Tabela 2	Percentual da atividade antioxidante dos extratos de <i>Hibiscus Sabdariffa</i> L. a diferentes porcentagens dos extratos em diferentes tempos de avaliação.....	53
Tabela 3	Determinação da composição mineral total de sépalas frescas de <i>Hibiscus Sabdariffa</i> L.	55

LISTA DE TABELAS - ARTIGO 2

Tabela 1	Valores médios (g/100g) dos parâmetros físico-químicos das sépalas e de extratos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	70
Tabela 2	Características físico-químicas dos extratos etanólico e hidroetanólico <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. em diferentes concentrações.....	71
Tabela 3	Valores de pH e contagem dos microrganismos mesófilos aeróbios de tratamentos contendo carne bovina moída com extratos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. a 50%.....	74

LISTA DE TABELAS - ARTIGO 3

Tabela 1	Atividade de extratos <i>Hibiscus sabdariffa</i> L., sobre <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> , em diferentes concentrações e tempos de contato.....	85
Tabela 2	Atividade antibacteriana de diferentes concentrações de extratos de <i>Hibiscos sabdariffa</i> L. em modelo cárneo contaminado experimentalmente com diferentes densidades populacionais de <i>Staphylococcus aureus</i> e <i>Escherichia coli</i> padrão.....	86
Tabela 3	Comportamento do pH e contagem das unidades formadoras de colônias/g de microrganismos mesófilos aeróbios em tratamentos contendo extratos de <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	88

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Flor, folhas e cálices de <i>Hibiscus Sabdariffa</i> L.	26
Figura 2	Classificação dos compostos fitoquímicos.....	27
Figura 3	Estrutura química dos flavonoides.....	28
Figura 4	Estrutura da antocianina cianidina 3-glucosídeo.....	30

LISTA DE ABREVEATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de variância
ATCC	American Type Culture Collection
ATT	Acidez total titulável
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHI	Brain Hearth Infusion
BHT	Butilhidroxi-tolueno
CHO	Carboidratos
CEPETEC	Centro de Ensino, Pesquisa e Tecnologia de Carnes
DPPH	2,2-difenil-1-picrihidrazil
DTAs	Doenças Transmitidas por Alimentos
EAG	Equivalentes de ácido gálico
EIEC	Enteroinvasivas
EHEC	Enterohemorrágica
EPEC	Enteropatogênica
ETEC	Enterotoxigênica
ERRO	Espécies reativas do oxigênio
ERN	Espécies reativas do nitrogênio
FAE	Feira de Agricultores Ecologistas
FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
FDA	Food and Drug Administration
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
ICP	Plasma indutivamente acoplado
ICTA	Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos
IDA	Ingestão Diária Aceitável
IDR	Ingestão Diária Recomendada
Kcal	Quilocalorias
kJ	Quilojoules
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
Mg	Miligrama
Nm	Nanômetro
NaCl	Cloreto de Sódio

PCA	Plate Cout Ágar
pH	Potencial hidrogeniônico
PM	Peso Molecular
RIISPOA	Regulamento Industrial de Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal
RS	Rio Grande do Sul
SAS	Statistical Analysis System
TBHQ	Terc-hidroxi-quinona
UFC/g	Unidade Formadora de Colônia por grama
UFRGS	Universidade Federal do Rio Grande do Sul
° GL	Graus Gay Lussac
° C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	TEMA DE PESQUISA	20
2.1	Problemas de pesquisa	20
2.2	Hipóteses de pesquisa	21
3	REVISÃO DE LITERATURA	23
3.1	Plantas medicinais, aromáticas e condimentares	23
3.2	<i>Hibiscus Sabdariffa</i> L.	25
3.3	Compostos Fitoquímicos	27
3.3.1	Polifenóis totais.....	28
3.3.2	Antocianinas totais.....	29
3.3.3	Ação dos Antioxidantes.....	31
3.4	Características físico-químicas dos alimentos	34
3.5	Composição centesimal	34
3.6	Potencial hidrogeniônico (pH) e Acidez	37
3.7	Carne: um alimento passível de contaminação bacteriana	39
3.8	Bactérias patogênicas	41
3.8.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	41
3.8.2	<i>Escherichia coli</i>	42
4	ARTIGO 1 - CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANÁLISES DE MINERAIS EM <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	44
5	ARTIGO 2 - CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE <i>Hibisco sabdariffa</i> L. E AVALIAÇÃO DA AÇÃO CONSERVANTE COMO ADITIVO CÁRNEO	60
6	ARTIGO 3 - Potencial antibacteriano dos extratos de hibisco e sua aplicação como aditivo cárneo	79
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	94
	REFERÊNCIAS.....	95
	APÊNDICE A - Laudo de Identificação Botânica - <i>Hibiscus sabdariffa</i> L. (MALVACEAE).....	107

INTRODUÇÃO

Aditivo alimentar é definido como qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem o propósito de nutrir, com o objetivo de modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação do alimento. Ao agregar-se, poderá resultar na conversão do próprio aditivo ou de seus derivados em componente (s) do alimento (BRASIL, 2009).

Tendo em vista satisfazer os consumidores com interesse em alimentos frescos, nutritivos, com alta qualidade organoléptica e tempo de prateleira aceitável, ganham destaque os aditivos alimentares de origem vegetal, como extratos, que possam atuar na ação conservante de alimentos (DEVLIEGHERE et al., 2004). A legislação brasileira define como conservador a substância que impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microrganismos ou enzimas (BRASIL, 1997).

Fatores de proteção antibacterianos entre os recursos naturais renováveis com plantas que tenham indicativo condimentar ou aromático e medicinal, são atrativos relevantes de pesquisa epidemiológica e na profilaxia de doenças transmitidas por alimentos, sendo prioridade segundo orientação da Organização Mundial da Saúde/Conferências Mundiais de Saúde (Akerle, 1993; Organização Pan-americana de La Salud, 1985; 1990), com ênfase nos aspectos culturais e tradicionais.

Existem diferentes aditivos naturais cultivados e utilizados em todo o mundo. Estudos conclusivos sobre esses aditivos têm demonstrado que eles apresentam propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais, e existem evidências de que o aumento seu consumo, podendo levar a uma mudança na microbiota intestinal, reduzindo a incidência de câncer, por exemplo. Sabe-se do efeito inibidor de determinados aditivos alimentares no crescimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos veiculados por alimentos (GERMANO; GERMANO, 2011).

O *Hibiscus sabdariffa* L. pertence à família *Malvaceae*, e está contem mais de 200 gêneros com cerca de 2.300 espécies de plantas. Provavelmente de origem africana, também cultivado em muitas áreas da Índia e partes da Ásia, América e Austrália possivelmente introduzido no Brasil pelos escravos. Conhecida no Brasil como Hibisco, e em alguns estados brasileiros também como quiabo-de-angola, azedinha, carurú,

caruru-da-guiné (MG), reselha (BA) e vinagreira (PA, CE, ES). O *Hibiscus sabdariffa* L. é uma importante planta medicinal, cujos estudos têm demonstrado efeitos terapêuticos, como antioxidante, antibacteriano, anti-hipertensivo, dentre outros (SIE et al., 2011; ESTEVES et al., 2014).

Os extratos obtidos dos cálices de hibisco contribuem ativamente para esses efeitos pois, são conhecidos por conter muitos constituintes fitoquímicos, que contribuem para sua atividade antioxidante, assim como para sua composição centesimal e nutricional (PETER et al., 2014; YANG et al., 2014; DOMINGUEZ-PERLES et al., 2014; NESPOLO et al., 2015).

O objetivo deste trabalho foi a caracterização fitoquímica, físico-química e mineral de extratos do *Hibiscus sabdariffa* L. e sua aplicação tecnológica em alimentos cárneos, estes contaminados por bactérias causadoras de infecções e toxinfecções alimentares e por bactérias deteriorantes, buscando-se demonstrar, outrossim, a possibilidade de ser alternativa para agregar valor e segurança sanitária a produtos que contenham matéria prima cárnea de origem bovina na óptica da agricultura/agroindústria familiar, de pequeno porte.

2 TEMA DE PESQUISA

Caracterização fitoquímica, físico-química e mineral do *Hibiscus sabdariffa* L. e atividade antioxidante de seus extratos, assim como, sua aplicação tecnológica visando efeito antibacteriano em modelo cárneo bovino que possa servir como fonte de infecções e toxinfecções alimentares por bactérias patogênicas e/ou deteriorantes.

2.1 Problemas de pesquisa

- a) Analisando a composição fitoquímica, especificamente, quais os teores presentes de compostos fenólicos (polifenóis) totais e de flavonoides (antocianinas) totais, nos extratos etanólico e hidroetanólico de *Hibiscus sabdariffa* L.?
- b) Quais os compostos minerais presentes nas sépalas de *Hibiscus sabdariffa* L.?
- c) Se os extratos etanólico e hidroetanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. possuem atividade antioxidante *in vitro*?
- d) Quais os parâmetros e características físico-químicos de *Hibiscus sabdariffa* L. e de seus respectivos extratos etanólico e hidroetanólicos?
- e) Qual a evolução da contaminação microbiana natural e do pH em carne bovina moída durante o armazenamento a 7 °C em diferentes períodos (dias), contendo como aditivo extratos etanólico e hidroetanólico de *Hibiscus Sabdariffa* L.?
- f) Qual a capacidade do extrato etanólico e hidroetanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. em inativar *in vitro* cepas padrão de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, ambos de importância em alimentos?
- g) Se ao aplicar os extratos etanólico e hidroetanólico selecionado a partir dos resultados obtidos nos ensaios *in vitro*, em modelo cárneo bovino moído contaminado experimentalmente, com diferentes doses infectantes de cepas padrão de *Staphylococcus*

aureus e *Escherichia coli*, é possível observar a existência de atividade antibacteriana *in loco*?

h) É possível observar uma correlação positiva entre as medidas de pH e a contagem de microrganismo mesófilos com o período de armazenagem em dias nos modelos cárneos contendo extratos etanólicos e hidroetanólicos de *Hibiscus sabdariffa* L.?

2.2 Hipóteses de pesquisa

a) Os extratos etanólicos e hidroetanólicos de *Hibiscus sabdariffa* L. apresentarão diferentes teores de antocianinas e polifenóis totais de acordo com os extratos analisados;

b) As sépalas de *Hibiscus sabdariffa* L. apresentarão teores variados de compostos minerais identificados;

c) Será possível identificar a atividade antioxidante dos extratos etanólicos e hidroetanólicos de *Hibiscus sabdariffa* L. a diferentes concentrações em variados tempos de observação;

d) Há distinção entre parâmetros e características físico-químicas quando comparados os extratos etanólico e hidroetanólico de *Hibiscus sabdariffa* L.;

e) Quando utilizados os extratos etanólico e hidroetanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. como aditivos cárneos, nos modelos experimentais, a temperatura controlada, serão observados diferentes comportamentos quanto a vida útil de prateleira;

f) O extrato etanólico e o extrato obtido por maceração hidroetanólica de *Hibiscus sabdariffa* L. terão atividades antibacterianas *in vitro* marcadamente distintas de acordo a cepa padrão em confronto;

g) Ao confrontar os extratos etanólico e hidroetanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. na carne moída bovina, com menores densidades populacionais iniciais dos inóculos padrão

Staphylococcus aureus ou *Escherichia coli*, maior será a capacidade de redução das unidades formadoras de colônia viáveis dessas bactérias;

h) Existirá uma correlação positiva entre a contagem de bactérias mesófilas, pH e a proporção de extrato como aditivo cárneo no período de vida útil do produto.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Plantas Medicinais, condimentares e aromáticas

O poder curativo das plantas é tão antigo quanto o aparecimento da espécie humana na terra. Nas antigas civilizações, através da observação do comportamento animal e de sua própria intuição, o homem passou a utilizar plantas como um agente curativo no combate às doenças (FREIRE, 2004; BADKE et al., 2011).

Na China foram encontradas evidências do uso de plantas medicinais há mais de 4 mil anos e na Índia a medicina tradicional mais conhecida “Auyrveda” é praticada há mais de 5 mil anos. O Papiro de Ebers do ano de 1550 AC, traz inúmeras descrições do uso de plantas e de seus extratos. Galeno (131-201 DC), médico do Imperador Marco Aurélio, colecionou e descreveu medicamentos e fórmulas (NOLLA et al., 2005; MARQUES et al., 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semi-sintéticos” (VEIGA Jr. et al., 1997). Salientando a importância das plantas medicinais, a OMS tem estimulado e valorizado sua utilização. Em 1978, a declaração de Alma-Ata enfatizou que 65-80% da população mundial emprega as plantas ou preparações delas derivadas na atenção à saúde, definida como “o bem-estar físico, mental e social”, para a prevenção de enfermidades (SILVA, 2003; JUNIOR et al., 2005; BRASIL, 2006). Alguns autores descrevem como sendo o único recurso terapêutico de comunidades e grupos étnicos em determinadas regiões (AKERELE; HERBAL, 1993; MACIEL et al., 2002).

O uso de plantas medicinais no Brasil emerge como uma alternativa terapêutica, consideravelmente influenciada pela cultura indígena, pelas tradições africanas e pela cultura europeia trazida pelos colonizadores (BRITO et al., 2009; LACERDA, et al., 2013). O país possui enorme biodiversidade de plantas com ação medicinal, onde calcula-se existir cerca de 55.000, ou seja, 20% do total de espécies no mundo (DE VASCONCELOS et al., 2014; IBGE, 2015).

Estes recursos naturais utilizados no cuidado humano, que antes estavam situados às margens das instituições de saúde, hoje tenta legitimar-se nesse meio dominado pelas práticas alopáticas (ENGELKE, 2003; ALVIM et al., 2004).

Conforme Silva (2002) a comprovação científica dos efeitos benéficos das plantas brasileiras, tidas popularmente como medicinais, tem despertado grande interesse junto aos pesquisadores de todo o mundo. O uso destes vegetais não pode ser considerado apenas como tradição cultural, mas como ciência que vem sendo investigada, aperfeiçoada e utilizada por parte da população, a qual pode trazer inúmeros benefícios aos usuários (TOMAZZONI et al., 2006).

Tendo em vista, as várias práticas foram difundidas pela cultura popular, aplicadas ao longo das gerações por meio de observação e experimentação. (PASA; AVILA, 2010; IOANNIDES-DEMOS et al., 2011; MARINHO et al., 2011).

Mesmo com o incentivo da indústria farmacêutica para a utilização de medicamentos sintéticos, grande parte da população ainda se utiliza de práticas complementares para cuidar da saúde, como o uso das plantas medicinais, empregada para aliviar ou mesmo curar algumas enfermidades (BADKE et al., 2011; DOS SANTOS et al., 2014)

Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais MACIEL et al., 2002.

Contudo, como consequência da grande difusão e utilização das plantas medicinais, as indústrias vêm produzindo produtos à base de espécies vegetais, de diversas formas farmacêuticas, que têm sido comercializados em farmácias, supermercados e casas de produtos naturais (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Atualmente, muitos fatores têm contribuído para o aumento da utilização das plantas como recurso medicinal, entre eles, o alto custo dos medicamentos industrializados, o difícil acesso da população à assistência médica, bem como a tendência ao uso de produtos de origem natural (FRIAS et al., 2011; MARINHO et al., 2011).

Tendo em vista satisfazer os consumidores com interesse em alimentos frescos, nutritivos, com alta qualidade organoléptica e tempo de prateleira aceitável, ganham destaque a adição de produtos de origem vegetal que possam conter antimicrobianos naturais (DEVLIEGHERE et al., 2004).

Além da propriedade aromatizante, realçar o sabor ou aspecto dos alimentos, os condimentos vegetais podem apresentar propriedades de conservação por atividade antibacteriana, que é de difícil verificação prática, pois as quantidades empregadas de condimento em relação ao produto são muito pequenas (JAY, 2005; RIEDEL, 2005;

EVANGELISTA, 2008), segundo Shelef (1984) variando de 0,5 a 1%, não apresentando ação antibacteriana que necessita de concentrações maiores a 1%.

Utilização de extratos de planta tem tido muitas ações, incluindo a conservação de alimentos crus e processados na medicina alternativa e terapias naturais (HAMMER et al., 1999).

Na alimentação, os extratos podem ser incluídos segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na Resolução Diretoria Colegiada (RDC) nº 23, de 15 de março de 2000 como Aditivo alimentar, definindo como

Qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, sem propósito de nutrir, com objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento (BRASIL, 2000).

Desta forma, os produtos botânicos como os extratos de plantas medicinais, condimentares e aromáticas apresentam-se com uma variedade de compostos capazes de atuarem na ação conservante de alimentos.

3.2 *Hibiscus Sabdariffa* L.

O *Hibiscus sabdariffa* L., pertence à família Malvaceae, que contém mais de 200 gêneros com cerca de 2.300 espécies de plantas. Trata-se de uma espécie de fácil reconhecimento pelo cálice e epicálice carnosos de coloração vermelha até vinácea. Os ramos, nessa espécie, são vermelhos, raramente apresentam acúleos cônicos esparsos entre si e as folhas, também vermelhos, possuem as lâminas foliares tri a penta partidas tendo um nectário sobre nervura média na face adaxial. É um arbusto herbáceo anual, medindo em torno de 1,52 a 5m de altura. Seu hábito é variável e quanto aos caracteres florais destacam-se as sépalas vermelhas e suas flores são brancas com pigmentação vermelha escura no centro, com o tubo estaminal inserto na corola conforme mostra a Figura 1. (LUZ; SÁ SOBRINHO, 1997; ROSS, 2003).

Provavelmente de origem africana, também cultivado em muitas áreas da Índia e partes da Ásia, América e Austrália possivelmente introduzido no Brasil pelos escravos. Conhecida no Brasil como Hibisco, e em alguns estados brasileiros também como quiabo-

de-angola, azedinha, carurú, caruru-da-guiné (MG), reselha (BA) e vinagreira (PA, CE, ES). Comumente conhecido como *Roselle* ou *Red Sorrel* em inglês e em árabe como Karkadeh. Amplamente cultivada em várias partes do mundo com fim alimentício SIE et al., 2011; ESTEVES et al., 2014).



Figura 1 - Flor, folhas e cálices de *Hibiscus Sabdariffa L.*

Fonte: a) <http://myseedgarden.blogspot.com.br>

Estudos etnobotânicos têm demonstrado que espécies de Malvaceae frequentemente são usadas na medicina tradicional para tratar enfermidades tais como malária, varíola, que apresentam febre e dor, e também por possuir muitas propriedades bioativas, tais como propriedades hepatoprotetora, antitumoral, antihiperlipidêmico, anti-inflamatórias, antivirais e propriedades antioxidante e antibacterianas (RICE et al., 1990; EL-NAGGAR; POLLEN, 2004; KIESSOUN et al., 2010; LIN et al., 2012; MEHDI et al., 2013).

Os extratos obtidos dos cálices de hibisco contribuem ativamente para esses efeitos pois, são conhecidos por conter muitos constituintes químicos incluindo alcaloides, ácido L-ascórbico, ácido cítrico, quercetina, antocianina e flavonoides, assim como são ricos em minerais como cálcio, magnésio, ferro, potássio e sódio (HERNÁNDEZ et al., 2009; ANOMOHANRAN, 2014; PETER et al., 2014).

Levando em consideração os atributos apontados pelos estudos acima, a parte importante da planta são as sépalas que cercam o fruto e formam os cálices mas, as folhas, caules, raízes, sementes também são usados para diferentes fins em alimentos, farmacêutico, aplicações industriais. Cálices vermelhos são utilizados para produção de geleias, bebidas, molhos, corantes e conservas alimentares (ABO-BAKER e MOSTADA, 2011; ANOMOHANRAN, 2014).

3.3 Compostos Fitoquímicos

A importância dos compostos naturais tem vindo a crescer nas últimas décadas. Os compostos fitoquímicos originados do metabolismo secundário das plantas, são essenciais no ambiente para o seu crescimento e reprodução, são resultantes da necessidade de proteção da planta frente a condições de estresse como insetos, injúrias, radiação solar, infecções, ferimentos, dentre outros (NACZK; SHAHIDI, 2004).

O termo “fitoquímico” refere-se a um grupo amplo de compostos produzidos e acumulados nas plantas. A classificação dos fitoquímicos está demonstrada na Figura 2.

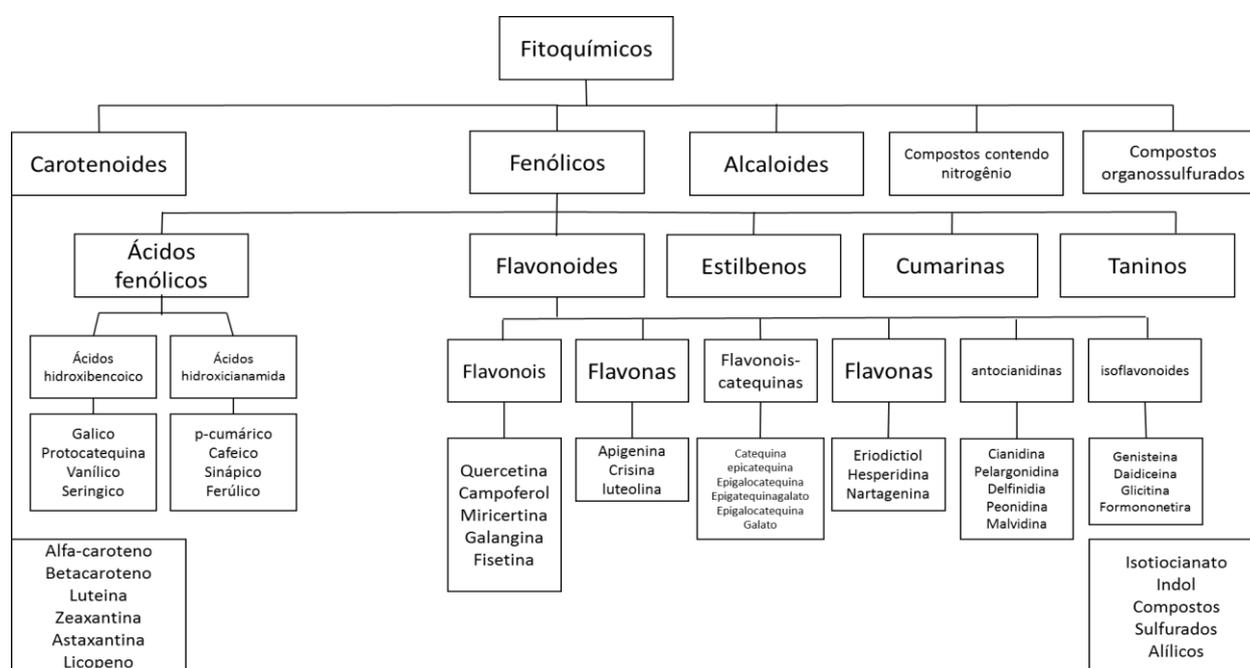


Figura 2 - Classificação dos compostos fitoquímicos

Fonte: Adaptado de Liu (2004).

Analisando quimicamente, os fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais. Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais (SHAHIDI; NACZK, 1995)

A quantificação espectrométrica de compostos fenólicos é realizada por meio de uma variedade de técnicas, todavia, a que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu ocorre entre as mais extensivamente utilizadas (POURMORAD et al., 2006; EVERETTE, et al., 2010; WOOTTON-BEARD et al., 2011; YANG et al., 2014).

Por sua vez, o teor destes fitoquímicos é amplamente influenciado por fatores genéticos, condições climáticas, solo e variedade (cultivares) analisada (HAIDA et al., 2011).

3.3.1 Polifenóis totais

No grupo de fitoquímicos observa-se uma grande diversidade estrutural destes compostos, ocorrendo na natureza uma variedade de combinações que levam a formação de diversas estruturas químicas que são chamadas de compostos fenólicos ou Polifenóis. Dentre eles estão incluídos os flavonoides (antocianinas, flavonas, isoflavonas), ácidos fenólicos, fenóis simples, cumarinas, flavonoides, taninos entre outros (HARBORNE et al., 1999; LEE et al., 2005).

Os flavonoides encontram-se distribuídos no reino vegetal, presentes em sementes, frutas, folhas, e em outras partes das plantas na forma de glicosídeos (ligação com açúcares) ou agliconas (sem ligação com açúcares). Possuem baixo peso molecular, consistindo átomos de 15 carbonos, tendo a estrutura comum de C₆-C₃-C₆ (PIETTA, 2000).

A estrutura química dos flavonoides consiste em dois anéis aromáticos, denominados anéis A e B, ligados por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado de anel C (Figura 3). O anel aromático A é proveniente do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina (MERKEN; BEECHER, 2000).

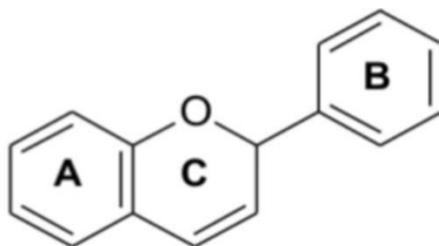


Figura 3 - Estrutura química dos flavonoides
Fonte: Angelo; Jorge (2007).

Variações no anel C padrão resultam em importantes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, proantocianidinas, antocianidinas, catequinas e

isoflavonas. Substituição dos anéis A e B originam diferenças dentro de cada classe de flavonoides (PIETTA, 2000).

Esses compostos apresentam-se como um grupo muito diversificado de fitoquímicos responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos como em frutas vermelhas e roxas, frutas cítricas, hortaliças, leguminosas, chás e no vinho tinto. Com propriedades antioxidantes, redutoras e quelantes, atuando como agentes redutores, doadores de hidrogénio e captadores de singletos de oxigénio, combatem os radicais livres, previnem doenças cardíacas, doenças neurodegenerativas, problemas do aparelho circulatório, cancro, inflamação e inibem a oxidação lipídica. Além disso, apresentam atividade antibacteriana, antivírica, antifúngica, anti-inflamatória, antioxidante entre outras atividades farmacológicas (PROESTOS et al., 2005; HAMAGUCHI, 2009; HUSSAIN, 2011; WATSON et al., 2014).

3.3.2 Antocianinas totais

As antocianinas são compostos fenólicos, pertencentes ao grupo dos flavonoides. O termo antocianina, derivado do grego de flor e azul (anthos = flores; kianos = azul), foi inventado por Marquart em 1853 para se referir aos pigmentos azuis das flores. Percebeu-se mais tarde que não apenas a cor azul, mas também várias outras cores observadas em flores, frutos, folhas, caules e raízes são atribuídas a pigmentos quimicamente similares aos que deram origem a “flor azul” (BROUILLARD, 1982; LIMA et al., 2003).

Esses pigmentos estão amplamente difundidos no reino vegetal, apresentando diferentes tonalidades de cor que oscilam entre vermelho, laranja e roxo. Ocorrem geralmente na forma de antocianinas, derivadas das antocianidinas. A Figura 4 é um exemplo de estrutura de antocianina presente na maioria dos vegetais, a cianidina 3-glucosídeo (BROUILLARD, 1982; FRANCIS et al., 1989; TEIXEIRA et al., 2008).

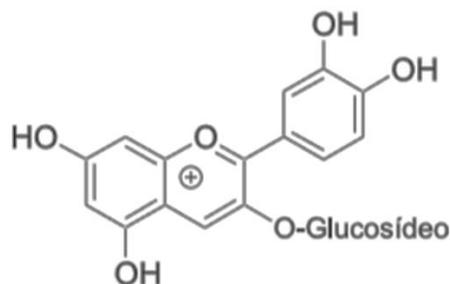


Figura 4 - Estrutura da antocianina cianidina 3-glucosídeo
 Fonte: Adaptado de Terzi (2004).

O açúcar presente nas moléculas de antocianinas confere maior solubilidade e estabilidade a estes pigmentos, quando comparados com as antocianidinas. O conhecimento da estrutura dos pigmentos, a influência de fatores como alterações de pH do meio, a presença de ácidos, açúcares, íons metálicos e temperatura, têm importância fundamental no estudo da estabilidade de antocianinas, visando seu possível uso em alimentos. Tendo como destaque para aplicações na fabricação de vinhos e como corantes naturais (DA COSTA, et al., 2000; TERCI, 2004).

A utilização de corantes na indústria de alimentos é uma prática rotineira, já que a cor e a aparência são atributos de qualidade em um alimento, exercendo uma enorme influência em seu valor estético, possuindo papel importante na aceitação dos produtos pelos consumidores. Entretanto, a utilização de antocianinas apresenta restrições em função de limitações, como a disponibilidade de matéria-prima produtora de pigmentos na quantidade e qualidade requerida, as dificuldades envolvendo processos de obtenção (extração, purificação e isolamento) e a baixa estabilidade apresentada pelas antocianinas (STRINGHETA, 1991).

As antocianinas compõem o maior grupo de pigmentos solúveis em água do reino vegetal encontrados no fluído da célula vegetal, que geralmente apresenta pH levemente ácido. De modo geral, em meio extremamente ácido (pH entre 1-2), as antocianinas apresentam coloração intensamente avermelhada devido ao predomínio da forma cátion flavílico (AH^+). São responsáveis pela coloração vermelha intensa da extração obtida a partir de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. mas, são instáveis durante condições de processamento e armazenamento (MARÇO; SCARMINIO, 2008; AISHAH et al., 2013).

Desta forma, as antocianinas além de atribuir coloração característica aos vegetais, apresentam propriedades que unem sua ingestão a hábitos saudáveis de alimentação. Falcão et al. (2003) fazem referência a trabalhos que demonstram atividades

anticarcinogênicas (HAGIWARA et al., 2001) e antioxidantes (WANG et al., 2000) assim como, Maciel et al. (2012) descrevem propriedades antibacterianas a estes pigmentos, promovendo associação destas propriedades aos alimentos que os contém.

As antocianinas representam uma importante alternativa para a substituição gradativa dos corantes sintéticos pois são abundantes na natureza, apresentam um amplo espectro de cores e, também devido aos efeitos benéficos à saúde humana. Avaliar a potencialidade dos processos de extração, purificação e utilização em alimentos permanece ainda um campo aberto à investigação científica (LOPES et al., 2012).

3.3.3 Ação dos antioxidantes

A oxidação é um processo essencial aos organismos aeróbios e ao nosso metabolismo, sendo os radicais livres produzidos naturalmente, como consequência desse processo, ou por alguma disfunção biológica. Nestes radicais, o elétron desemparelhado encontra-se no átomo de oxigênio ou nitrogênio, sendo assim, estes radicais classificados como espécies reativas do oxigênio (ERO) ou espécies reativas do nitrogênio (ERN) (AMES et al., 1993; BARREIROS et al., 2006).

Os EROs atacam as cadeias de ácidos graxos poli-insaturados dos fosfolípidios e do colesterol, abstraindo um hidrogênio do grupo metileno bis-aliílico, iniciando assim o processo de peroxidação lipídica nas membranas celulares. O resultado deste processo é a oxidação de várias moléculas de ácidos graxos (HASLAM, 1996; OMONI; ALUKO, 2005).

Os radicais livres são moléculas instáveis e muito reativas no organismo, o excesso desses radicais pode ser responsável por uma série de efeitos deletérios como o envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, bem como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (AMES et al., 1993; BARREIROS et al., 2006; ALVES et al., 2010).

O organismo humano está sujeito ao estresse oxidativo causado por radicais livres provenientes do meio ambiente ou geradas pelo próprio organismo. Cabe às micromoléculas, tais como tocoferóis, carotenoides e flavonoides entre outros, o papel de impedir o ataque de radicais livres ou regenerar os danos causados em sistemas biológicos essenciais (BARREIROS et al., 2006).

Tem sido crescente o interesse no estudo sobre o uso de antioxidantes na indústria de alimentos e seus mecanismos funcionais. O retardamento das reações oxidativas por certos compostos foi primeiramente registrado por Berthollet, no ano de 1797, e depois esclarecido por Davy, em de 1817. O processo da rancificação de lipídeos não era conhecido até Duclaux demonstrar que o oxigênio atmosférico era o mais importante agente causador de oxidação do ácido graxo livre. Somente anos depois, Tsujimoto descobriu que a oxidação de triglicerídeos altamente insaturados poderia ser o causador do odor de ranço em óleo de peixe (BAILEY et al., 1996; MUKAI et al., 1993).

De forma geral, as substâncias presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, que possuem a finalidade de inibir ou retardar a oxidação lipídica de óleos, gorduras e alimentos gordurosos são os compostos químicos conhecidos como antioxidantes (ATOUI et al., 2005).

A principal causa de deterioração dos corpos graxos (lipídios e matérias graxas) é a peroxidação lipídica. Afastados da sua contextualização de proteção natural, os corpos graxos sofrem, ao decorrer de processos de transformação e armazenamento, alterações do tipo oxidativo, as quais tem como consequência a modificação do flavor original e o aparecimento de odores e gostos característicos do ranço, o qual representa para o consumidor, ou para a indústria, uma importante causa de depreciação ou rejeição (CASTERA-ROSSIGNOL; BOSQUE, 1994).

A ação dos radicais livres pode ser comprometida por substâncias antioxidantes, as quais podem ser sintéticas e naturais. Na indústria alimentícia dentre as sintéticas, estão incluídos o BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butilhidroxi-tolueno) e terc-hidroxi-quinona (TBHQ), comumente utilizados em alimentos contendo lipídios, porém apresentam problemas de segurança e toxicidade. Perante as substâncias naturais, provenientes da dieta alimentar, destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), selênio e carotenoides. Sendo assim, as pesquisas têm-se voltado no sentido de encontrar produtos naturais com potencial ação antioxidante que possam substituir os sintéticos ou fazer associação entre eles (HASLAM, 1996; BURDA; OLESZEK, 2001; SOARES, 2002; OMONI; ALUKO, 2005).

Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural destacam-se os polifenóis, principalmente os flavonoides presentes nos alimentos que contribuem para a defesa contra o stress oxidativo, sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E. Os antioxidantes naturais podem proteger o corpo humano de radicais livres e retardar o ranço oxidativo provocado por lipídios em alimentos através da ação

da luz, temperatura e umidade (FAURÉ et al.,1990; HASLAM, 1996; SOARES, 2002; BAEZA et al., 2014; DOMINGUEZ-PERLES et al., 2014).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Por apresentarem oscilações após atuarem no combate aos radicais livres, os compostos fenólicos possuem uma determinada estabilidade (SOARES, 2002; BARREIROS et al., 2006).

Estas características desempenham um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo. (HASLAM, 1996; SOARES, 2002; CHUN et al., 2005)

O mecanismo complexo de atividade anti e pró-oxidante destas substâncias é alvo de estudos científicos, tendo em vista que o sucesso destas investigações está relacionado com a melhoria da qualidade de vida do ser humano. Considerando que substâncias naturais podem ser responsáveis pelo efeito de proteção contra os riscos de muitos processos patológicos, os resultados descritos em vários trabalhos estimulam a continuidade dos estudos para avaliar a ação antioxidante de substâncias isoladas de espécies de plantas medicinais, condimentares ou aromáticas (ALVES et al., 2010; WOOTTOM-BEARD et al., 2011; MACIEL et al., 2012; YANG et al., 2014).

3.4 Características físico-químicas dos alimentos

3.5 Composição centesimal

As necessidades nutricionais requeridas pelo organismo humano nos estados de saúde e doença tem sido objeto de intensa investigação nos últimos anos, bem como a preocupação quanto a caracterização química dos alimentos com potencial econômico e nutricional, em especial os de baixo valor calórico, uma vez que, a obesidade e as doenças crônico-degenerativas (doenças cardiovasculares, diabetes mellitus e câncer) passam a ser destaque em saúde pública já que danos à saúde podem ocorrer devido uma alimentação incorreta (TEIXEIRA NETO, 1993; OLIVEIRA; MARCHINE, 1998).

Os alimentos desempenham importante papel na manutenção da vida do ser humano, fornecendo os elementos nutricionais e calóricos necessários para o funcionamento do organismo (tais como carboidratos, lipídios, proteínas, fibra alimentar e minerais entre outros). Assim, observa-se crescente interesse pelos alimentos funcionais que ajustam e modulam o sistema fisiológico do corpo humano de modo a promover saúde e prevenir doenças (TULEY, 1995; ARAI, 1996).

Os três substratos energéticos básicos são os carboidratos, proteínas e lipídeos provenientes dos alimentos e oxidados pela célula para a produção de energia. Como fonte de energia, as proteínas são equivalentes aos carboidratos, fornecendo 4 Kcal/g. Os lipídeos são energeticamente importantes porque produzem 9 Kcal/g quando oxidados no organismo. A recomendação para ingestão calórica por dia varia conforme idade, sexo, peso, altura e grau de atividade física (DUTRA DE OLIVEIRA; MARCHINI, 1998).

Dietas ricas em carboidratos complexos são consideradas úteis na prevenção da obesidade, de vários tipos de câncer e no controle da hiperlipidemia e do diabetes mellitus (WHO, 1990).

Os carboidratos (CHO) são considerados as biomoléculas mais abundantes da natureza, seja na forma de carboidrato complexo (amido e/ou celulose) ou na forma de açúcar (dissacarídeos) como a sacarose, além da glicose e da frutose, que são os monossacarídeos comuns da dieta. São macronutrientes formados por uma ou mais moléculas de glicose, que caracterizam a qualidade do nutriente, sendo que a partir do seu catabolismo ocorre a liberação do fornecimento de energia para a realização das funções biológicas do organismo, especialmente ao sistema nervoso central, armazenado sob

forma de glicogênio (DUTRA DE OLIVEIRA; MARCHINI, 1998; LOTTENBERG, 2008).

Os lipídios são moléculas altamente energéticas e geralmente, aparecem em quantidades baixas em frutos e hortaliças. Os maiores teores são encontrados em sementes, principalmente nas oleaginosas. Encontrados em tecidos vegetais e animais, são insolúveis em água e solúveis em solventes orgânicos. Compõem as membranas biológicas e servem como reserva energética. Sugere-se que as dietas contenham baixo teor de colesterol, ácidos graxos trans. e gorduras saturadas, tendo em vista a correlação positiva da ingestão desses lipídios e o aumento de doenças cardiovasculares. (McDONALD et al, 1999; BUCHANAN et al, 2000).

Os lipídeos de origem vegetal são ricos em ácidos graxos insaturados, sendo que muitos deles contêm ácidos graxos ômega que apresentam efeitos benéficos para a saúde do consumidor, em relação à prevenção de doenças cardiovasculares (AHMED; BARMORE, 1990; RIBEIRO et al, 1995).

Dados obtidos a partir de pesquisas em humanos confirmam a adequação das proteínas vegetais no suprimento das necessidades de adultos e de crianças. Embora um determinado alimento vegetal possa ser deficiente em um aminoácido específico, não é correto dizer que seja incompleto. Um único alimento vegetal, se usado como a única fonte de proteína, pode provar-se inadequado; entretanto, misturas apropriadas de alimentos vegetais são equivalentes à proteína animal em qualidade. As proteínas vegetais *in natura* são, em geral, menos digeríveis que proteínas animais. Métodos de processamento podem ter efeitos benéficos ou prejudiciais na qualidade nutritiva das proteínas vegetais. Consumir uma ampla variedade dos alimentos assegura um consumo adequado de aminoácidos. Além disso, comparado com a proteína animal, fontes vegetais contribuem para menor gordura total, gordura saturada e colesterol, para mais carboidrato e fibras (SOLOMONS, 1994).

A ingestão de alimentos ricos em fibras, pobres em gorduras e a alimentação predominantemente rica em frutas e verduras, têm sido recomendadas por apresentar diminuição do risco de doenças crônicas como artrite, osteoporose, hipertensão, diabetes e cardiopatias (PARK et al., 1997).

Fibras alimentares despertam interesse de pesquisadores de diversas áreas como as da alimentação e saúde. As propriedades físico-químicas das fibras alimentares podem produzir diferentes efeitos fisiológicos no organismo. As fibras alimentares são responsáveis, por exemplo, pelo aumento da viscosidade do conteúdo intestinal e redução

do colesterol plasmático. As fibras alimentares ajustam o funcionamento intestinal, o que as tornam relevantes para o bem-estar das pessoas saudáveis e para o tratamento dietético de várias patologias (DE MATTOSA; MARTINS, 2000).

Os minerais desempenham uma importante função no desenvolvimento e saúde do corpo humano, sendo as frutas e hortaliças consideradas as principais fontes de vitaminas, minerais e fibras necessários para a dieta humana. Promovem a regulação da atividade enzimática, manutenção do equilíbrio ácido-base e da pressão osmótica, são constituintes estruturais de tecidos corporais (ossos, dentes), estão envolvidos diretamente no crescimento e desenvolvimento do organismo e interferem no transporte de nutrientes. Os minerais são, portanto, tão essenciais quanto as vitaminas para manter o organismo em um estado de saúde apropriado (HARDISSON et al, 2001; CARMO, 2011).

Os minerais podem ser divididos em dois grupos: macrominerais (minerais necessários para os seres humanos em quantidades maiores ou iguais a 100mg/dia, como cálcio, fósforo, magnésio, enxofre e potássio) e microminerais (minerais necessários para os seres humanos em quantidades menores que 100 mg/dia, como cobre, ferro, manganês, boro e zinco) (NESPOLO et al., 2015).

A Ingestão Diária Recomendada (IDR) de minerais é a quantidade que deve ser consumida diariamente para atender às necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos e grupos de pessoas saudáveis (GERMANO; GERMANO, 2011).

Os minerais são necessários ao bom funcionamento do organismo e devem ser ingeridos de acordo com as doses diárias recomendadas (Tabela 1).

Tabela 1 - Dose diária recomendada de minerais

Dose diária recomendada	
Mineral	Individuo Adulto (mg)
Fósforo (P)	700
Potássio (K)	2000
Cálcio (Ca)	800
Magnésio (Mg)	375
Cobre (Cu)	1
Zinco (Zn)	10
Ferro (Fe)	14
Manganês (Mn)	2

Fonte: Adaptado do Decreto-Lei n.º 217/2008 de 11 de Novembro e Regulamento (CE) n.º 1169/2011 de 25 de Outubro.

Para a população consumir equilibradamente os nutrientes de acordo com a IDR, são necessários dados sobre composições de alimentos. Essas composições são importantes para inúmeras atividades, como para avaliar o suprimento e o consumo alimentar de um país, verificar a adequação nutricional da dieta de indivíduos e de populações, avaliar o estado nutricional, desenvolver pesquisas sobre as relações entre dieta e doença, em planejamento agropecuário, na indústria de alimentos, além de outras (BRASIL, 1998; TORRES et al., 2000; NESPOLO et al., 2015).

3.6 Potencial hidrogeniônico (pH) e Acidez

O pH é a medida de acidez ou a alcalinidade de uma substância (alimento). O comportamento do meio tem grande influência na estabilidade de macromoléculas, como enzimas, o que influi tanto no crescimento como no metabolismo dos microrganismos (GERMANO; GERMANO, 2011; SILVA jr, 2013). Para melhor exemplificar, na Tabela 2 são apresentados os graus de acidez de diversos tipos de alimentos.

Tabela 2 - Graus de acidez de diversos tipos de alimentos

Grau de Acidez	pH	Tipos de Alimentos
Pouco ácidos	>4,5	Leite, carnes, pescados, alguns vegetais
Ácidos	4,0 a 4,5	Frutas e hortaliças
Muito Ácidos	< 4,0	Sucos de frutas e refrigerantes

Fonte: Adaptado de Silva jr. (2013)

A maioria dos microrganismos desenvolvem-se melhor em valores de pH próximos a 7 (6,6 – 7,5). Em geral as bactérias se multiplicam com maior rapidez na escala de pH compreendida entre 6 e 8, com algumas exceções, como bactérias lácticas e acéticas. Cada microrganismo possui um valor ideal de pH, no qual sua multiplicação é máxima (Tabela 3). Saindo da faixa de pH ótimo o microrganismo terá sua multiplicação diminuída (FORSYTHE, 2013).

Tabela 3 - Limites de multiplicação microbiana referentes ao pH

Microrganismo	Faixa de pH	
	Mínimo	Máximo
<i>Salmonella</i> spp	3,7	9,5
<i>Staphylococcus aureus</i>	4,0	10
<i>Escherichia coli</i>	4,0	9,0
<i>Clostridium perfringens</i>	5,0	9,0
<i>Listeria monocytogenes</i>	4,4	9,4

Fonte: Adaptado de Forsythe, 2013.

O emprego da acidificação na conservação dos alimentos é um método bastante efetivo, uma vez que os principais patógenos de origem alimentar se multiplicam melhor em pH neutro. Esses organismos, no entanto, são capazes de tolerar e adaptar-se a estresses causados por ácidos fracos, o que os habilita a sobreviver à passagem pelo estômago humano. O estresse ácido é um efeito combinado entre baixos pHs e ácidos fracos, ácidos orgânicos, estes são utilizados como conservantes mais comuns. Exemplos são: ácidos acéticos, láctico, benzoico e sórbico. Esses ácidos inibem a multiplicação das células bacterianas e fungicas, essa solução conservante do tipo ácido fraco existe em equilíbrio dependente do pH (FORSYTHE, 2013).

O pH adverso afeta dois aspectos da célula microbiana: o funcionamento de suas enzimas e o transporte de nutrientes no interior da célula (GERMANO; GERMANO, 2011; NESPOLO et al., 2015).

Os métodos de conservação se baseiam não só na redução parcial ou total da ação dos elementos deterioradores, mas também na modificação ou eliminação de uma ou mais das condições necessárias à vida microbiana, tornando o substrato um meio inadequado aos microrganismos. Conservantes são necessários para garantir que os produtos manufaturados permaneçam seguros isentos de microrganismos nocivos e de suas toxinas e com qualidade durante suas vidas de prateleira, que deverão manter suas características durante o maior tempo possível (SILVA jr. 2013; NESPOLO et al., 2015).

3.7 Carne: um alimento passível de contaminação bacteriana

Do ponto de vista econômico, a indústria de carnes é uma das principais do setor de alimentos, sendo o maior em termos de geração de empregos e volume de recursos e capital. Dados da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) indicam que a produção de carnes alcançou 292 milhões de toneladas equivalentes a carcaça em 2010. Segundo o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) no 3º trimestre de 2014, foram abatidas 8.457 milhões de cabeças de bovinos sob algum tipo de serviço de inspeção sanitária (GOMIDE, 2013; IBGE, 2014)

Como uma definição mais abrangente, pode-se considerar carne como todo e qualquer tecido animal propício ao consumo humano. Assim, embora o tecido muscular esquelético seja o principal constituinte da carne, essa definição também inclui os outros tecidos, como adiposo e ósseo, além de glândulas, vísceras e órgãos, desde que sadios e obtidos sob condições higiênico-sanitárias satisfatórias (GOMIDE et al, 2013).

Entretanto, segundo o artigo 17 do Regulamento Industrial da Inspeção Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA) “por carne de açougue entende-se as massas musculares maturadas e demais tecidos que as acompanham, incluindo ou não a base óssea correspondente, procedentes de animais abatidos sob inspeção veterinária” (BRASIL, 1952).

Em nosso país, a carne bovina é um produto altamente versátil, podendo ser encontrada em diferentes cortes e apresentações, incluindo o seu emprego em inúmeros derivados cárneos. Na forma de carne moída, torna-se popular, sendo acessível à faixa da população com menor poder aquisitivo (MOTTA et al., 2000).

Carne moída é o “produto cárneo obtido a partir da moagem de massas musculares de carcaças de bovinos, seguido de imediato resfriamento ou congelamento” (BRASIL, 2003).

Em virtude do seu alto valor biológico a carne está propensa a deterioração, que é resultado da atividade metabólica de microrganismos presentes que podem causar alterações físicas, químicas ou sensoriais, isto é, alterações na cor, odor, textura, sabor ou aspecto desses alimentos. O tempo de vida de prateleira é um atributo importante de todos os alimentos. Pode ser definido como o tempo transcorrido desde a produção e a embalagem do produto até o ponto em que se torna inaceitável para o consumo. É relacionado então com a qualidade total do alimento (FORSYTHE, 2013).

Alguns limites microbiológicos sugeridos para vida de prateleira (indicadores de qualidade) são representados na Tabela 4.

Tabela 4 - Limites microbiológicos sugeridos para vida de prateleira

Produto	Contagem microbiana	Comentários
Carne crua	1x10 ⁶ UFC/g Contagem aeróbia em placas	Deterioração visível e/ou limo a 1x10 ⁷ UFC/g
Carne moída	1x10 ⁷ UFC/g	Fim da vida de prateleira, descoloração e formação de limo
Alimentos pré-prontos embalados a vácuo	1x10 ⁶ UFC/g Contagem aeróbia em placas	Representa o ponto em que uma alteração do pH >0,25 ocorre
Alimentos cozidos	1x10 ⁶ UFC/g Contagem aeróbia em placas 1x10 ³ Enterobacterias	

Fonte: Adaptado de Forsythe, 2013.

Na carne moída ou na carne de hambúrguer bovina são evidenciadas, predominantemente, as bactérias deteriorantes aeróbias Gram-negativas como *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Moraxella* e *Aeromonas*, que crescem na superfície desses alimentos e, ocasionalmente, as anaeróbias Gram-positivas como *Lactobacillus*, que se desenvolvem no interior (JAY, 2005; FORSYTHE, 2013).

O elevado número desses microrganismos está diretamente relacionado a condições higiênico- sanitárias desfavoráveis. A contagem de bactérias aeróbias mesófilas é utilizada como indicador geral de populações bacterianas em alimentos e superfícies, avaliando a qualidade do produto, práticas de manipulação, das matérias-primas, condições de processamento e vida de prateleira (CAPITA et al. 1999; DA SILVA et al, 2007).

A carne bovina em cortes e moída *in natura* tem sido reconhecida como fonte primária de infecção quando manipulada incorretamente, ocasionando graves consequências à saúde dos seres humanos, tanto para os próprios manipuladores como os consumidores (LOGUERCIO et al., 2002; PARDI et al.,2006,).

Estudos desenvolvidos em diferentes cidades e regiões do país revelam os índices de contaminação microbiológica em carne bovina moída (SOUSA et al., 2012; DO NASCIMENTO et al., 2014) e em cortes cárneos bovinos (GELLI et al. 2005; MATOS

et al., 2012). Todos os autores concluem sobre as precárias condições deste produto que está sendo oferecido ao consumidor.

3.8 Bactérias patogênicas

3.8.1 Staphylococcus aureus

No contexto das doenças transmissíveis em saúde coletiva, a importância do gênero *Staphylococcus* permanece em evidência, considerando que o portador humano constitui a sua principal fonte de infecção, estimando-se que 30 a 35 % das pessoas sadias albergam esta bactéria na nasofaringe ou na pele. Por sua vez, até 100% de suínos e aves podem albergar este agente zoonótico em sua pele ou trato respiratório superior. Sob o olhar epidemiológico, seu envolvimento na mastite bovina subclínica constitui outra preocupação constante, podendo os animais produtores de carne e de leite contribuir, significativamente, na contaminação das diferentes cadeias alimentares (ACHA; SZYFRES, 2003).

O *Staphylococcus* é uma bactéria esférica (coco) Gram-positiva, que ocorre em pequenas cadeias ou em cachos similares aos de uva. Existem no ar, na poeira, no esgoto, na água, no leite e nos alimentos ou nos equipamentos de processamento de alimentos, nas superfícies expostas aos ambientes, nos seres humanos e nos animais, sendo estes dois últimos os principais reservatórios do agente (FORSYTHE, 2013).

Segundo dados do Centro Estadual de Vigilância em Saúde do Estado do Rio Grande do Sul (RS), no período de 1987 a 2002, *Staphylococcus aureus* foi um dos principais agentes etiológicos entre os identificados no RS. Frequentemente isolados de carne, ovos, alimentos frescos e outros produtos de origem animal (RIO GRANDE DO SUL, 2006; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, 2010).

A bactéria pode ocorrer em diversos alimentos que não sofreram tratamento térmico suficiente para a sua destruição, deste modo à incidência de intoxicação estafilocócica também se dá pela manipulação e pela refrigeração inadequados dos produtos. Os alimentos cárneos são um meio adequado para o desenvolvimento de estafilococos, “as bactérias pertencentes a este gênero são tolerantes a concentração de 10% de NaCl e também a nitritos, sendo assim também podem permanecer vivas em alimentos curados” (CORBIA et al, 2000; JAY, 2005).

Segundo a Resolução RDC nº 12 de 02 de janeiro de 2001, a enumeração de *Staphylococcus* coagulase positiva tem por objetivo substituir a determinação de *Staphylococcus aureus* (BRASIL, 2001).

De acordo com Franco e Landgraf (2005) é necessário entre 10^5 e 10^6 UFCs de *Staphylococcus aureus* e/ou de 1 µg de toxina por grama de alimento para se iniciarem os sintomas clínicos, incluindo náusea, vômito, espasmo abdominal e, ocasionalmente, diarreia.

No Brasil, entre 1999 e 2008, foram notificados 6.062 surtos de DTAs, envolvendo 117.330 pessoas doentes e 64 óbitos. Dentre os agentes etiológicos identificados, *Staphylococcus* sp destacou-se com a segunda maior prevalência, alcançando 20,2% dos isolamentos (BRASIL, 2008). O autor ainda relata que dentre os alimentos envolvidos em surtos destacam-se as carnes vermelhas envolvidas em 466 dos casos confirmados, totalizando 11,7% dos alimentos mais frequentes.

No Rio grande do Sul, no período de 2006 a 2007, foram investigados 186 surtos alimentares, dos quais 104 (56%) apresentaram amostras contaminadas, destacando-se estafilococos coagulase positiva em 28% dos surtos investigados, sendo que os principais alimentos envolvidos foram os produtos cárneos em 36% dos casos (WELKER et al., 2010).

Na análise da série histórica de surtos do estado do Rio Grande do Sul, o número de surtos atribuídos a *Staphylococcus aureus* mantém-se estável (RIO GRANDE DO SUL, 2006).

3.8.2 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, que faz parte do grupo *Enterobacteriaceae*, não formadora de endósporos, anaeróbica facultativa. É um mesófilo típico capaz de se desenvolver entre 7 e 46 °C, sendo 37 °C a temperatura ótima. O pH próximo do neutro propicia condições ótimas para o desenvolvimento. As cepas patogênicas de *Escherichia coli* são divididas de acordo como os sintomas clínicos e com os mecanismos de patogenicidade, em vários grupos que podem variar em seus períodos de incubação e duração da enfermidade. Também há uma variação considerável na virulência. Por exemplo, nas infecções enterohemorrágicas e enteroinvasivas doses pequenas (10 células ou menos) podem causar enfermidades graves, enquanto a *E. coli*

enterotoxigênica requer um número de células estimado em 10^8 a 10^{10} para causar enfermidade (FORSYTHE, 2013).

A *E. coli* é encontrada, normalmente, nos intestinos dos animais e do homem. Representa 80% da flora intestinal aeróbia, sendo eliminada nas fezes, o que propicia a contaminação dos solos e das águas. As diarreias causadas pela *E. coli* apresentam distribuição mundial, contudo a real extensão da incidência não está dimensionada, principalmente devido à elevada subnotificação de casos (GERMANO; GERMANO, 2011).

São conhecidas quatro classes enterovirulentas do patógeno, responsáveis por quatro gastroenterites no homem: Enteropatogênica (EPEC) - acomete recém nascidos e lactantes; Enterotoxigênica (ETEC) – provoca a diarreia infantil e dos viajantes; Enteroinvasivas (EIEC) – Acomete jovens e adultos; e Enterohemorrágica (EHEC) – Acomete com bastante gravidade, preferencialmente, crianças e idosos (GERMANO; GERMANO, 2011; FORSYTHE, 2013).

A carne bovina moída é a maior responsável pela ocorrência de surtos de *E. coli*, sobretudo quando consumida crua ou insuficientemente cozida. Ela constitui, também a causa mais comum de infecções enterohemorrágicas e enteroinvasivas. Em 66 amostras de carne moída comercializada na região sul do Brasil, uma análise mostrou que 72,7% encontrava-se contaminado com *E. coli*, a maioria confirmada como EPEC, e apenas duas isoladas com O157 (GERMANO; GERMANO, 2011).

4 - ARTIGO 1

Artigo a ser submetido a Revista do Instituto Adolfo Lutz

CARACTERÍSTICAS FITOQUÍMICAS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANÁLISES DE MINERAIS EM *Hibiscus sabdariffa* L.

FEATURES PHYTOCHEMICAL, ANTIOXIDANT AND MINERAL ANALYSIS ACTIVITY IN *Hibiscus sabdariffa* L.

Marcelo Pinto PAIM^{1*}, Paula MANGOBA², Elísio José CHIVITE³; Simone WESCHENFELDER⁴, Heloisa H. C. CARVALHO⁵; José M. WIEST⁶, César A. M. AVANCINI⁷

^{1,7}Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, Avenida Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre - RS/Brasil

^{2,3,4,5,6}Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, Avenida Bento Gonçalves, 9500, CEP 91505-970, Porto Alegre - RS/Brasil

*Correspondência: Marcelo Pinto Paim, E-mail: marcelloppaim@yahoo.com.br

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença dos componentes fitoquímicos e a atividade antioxidante de extratos etanólico e hidroetanólico a diferentes concentrações de *Hibiscus sabdariffa* L., bem como, caracterizar o hibisco quanto a sua importância nutricional através da determinação dos elementos minerais essenciais nas sépalas de *Hibiscus sabdariffa* L. Para as análises fitoquímicas, foram utilizados como amostras os cálices *in natura*, secos e seus respectivos extratos etanólicos e hidroetanólicos. Foram realizadas as seguintes análises: Polifenóis totais, Antocianinas, e Atividade antioxidante e a caracterização do conteúdo de minerais expressos em dez elementos, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Zn, Fe, Mn e B determinados em sépalas de hibisco. Resultados mostraram que os valores obtidos para polifenóis e antocianinas nas duas formas de extratos apresentaram valores crescentes similares, quando comparadas as porcentagens, mostrando que ambos são fonte desses fitoconstituintes. Quanto à atividade antioxidante, os valores máximos de inibição para ambos extratos ocorreram no tempo total de observação (60 min), principalmente, pelo extrato hidroetanólico. Quanto aos teores de minerais, as amostras *in natura* apresentaram níveis de K (1966,67 mg/100 g), Ca (930,00 mg/100 g) e Mn (13,13 mg/100 g) acima de 90 % da ingestão diária recomendada pela legislação vigente. Este estudo sugere que os extratos de *Hibiscus sabdariffa* L. tem o potencial para ser utilizado como fonte de compostos fitoquímicos, minerais e pela ação antioxidante em alimentos.

Palavras-chave: *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco); Parâmetros fitoquímicos; Minerais.

ABSTRATC

The specific aim of this study was to determine the phytochemical properties in extracts and the composition of minerals in sepals of glasses of *Hibiscus sabdariffa* L.. For phytochemical analysis, were used as samples the cups fresh, dried and their ethanol extracts and hydroethanolic. The following tests were performed: total polyphenols, anthocyanins, and antioxidant activity, and characterizing the mineral content expressed in ten elements, P, K, Ca, Mg, S, Cu, Zn, Fe, Mn and B determined in sepals hibiscus . Results showed that the values obtained for polyphenols and anthocyanins in both extracts showed similar forms of increasing values, when the percentage compared, showing that both are sources of these phytochemicals. As for the antioxidant activity, inhibition maxima for both extracts were total observation time (60 min), mainly by hydroethanolic extract. As the mineral composition, the fresh samples showed levels of K (1966.67 mg / 100g), Ca (930.00 mg / 100 g) and Mn (13.13 mg / 100g) over 90% of the recommended daily intake by law. This study suggests that *Hibiscus sabdariffa* L. has the potential to be used as a source of phytochemicals compounds, minerals and the antioxidant in foods.

Key words: *Hibiscus sabdariffa* L. (hibiscus); Phytochemical parameters; Minerals.

INTRODUÇÃO

O *Hibiscus sabdariffa* L. (Hibisco), também conhecido como rosele, rosela e azedinha, dentre outros, pertence à família Malvaceae de origem africana, possivelmente introduzido no Brasil pelos escravos. É uma planta tropical de considerável potencial econômico que pode ser encontrada em quase todos os países tropicais do Sudeste Asiático como Malásia, Indonésia, Tailândia e Filipinas (LUZ, 1997; CHEWONARIN et al., 1999).

Na medicina popular a planta é utilizada como diurética, calmante e antiescorbútica. O hibisco tem, ainda, um enorme potencial como fonte de corante para a indústria alimentícia (ABO-BAKER e MOSTADA, 2011). Os cálices são amplamente utilizados para preparar bebidas frias e quentes e para fazer doces e geleias (TSAI et al., 2002).

Na alimentação, os extratos podem ser incluídos segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), na Resolução Diretoria Colegiada (RDC) nº 23, de 15 de março de 2000 como Aditivo alimentar, definindo como qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos, com objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais, durante a fabricação, embalagem, acondicionamento, armazenagem, transporte ou manipulação de um alimento. Ao agregar-se poderá resultar em que o próprio aditivo ou seus derivados se convertam em um componente de tal alimento (BRASIL, 2000).

Os cálices de hibisco são relatados como ricos em antioxidantes tais como flavonóides e também minerais (FASOYIRO et al., 2005). Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexo de metais (PIETTA, 2000).

A Ingestão Diária Recomendada (IDR) de minerais é a quantidade que deve ser consumida diariamente para atender às necessidades nutricionais da maior parte dos indivíduos e grupos de pessoas saudáveis (GERMANO e GERMANO, 2011). Para a população consumir equilibradamente os nutrientes de acordo com a IDR, são necessários dados sobre composições de alimentos (BRASIL, 1998; TORRES et al., 2000; NESPOLO et al., 2015), possibilitando o uso complementar dos mesmos.

Neste contexto, se faz necessária a caracterização da matéria-prima para elencar subsídios à indústria de alimentos, o presente estudo objetivou avaliar a presença de componentes fitoquímicos e a atividade antioxidante de extratos etanólico e hidroetanólico a diferentes concentrações de *Hibiscus sabdariffa*, bem como, caracterizar o hibisco quanto à sua importância nutricional através da determinação dos elementos minerais essenciais nas sépalas de *Hibiscus sabdariffa*.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos no laboratório de higiene de alimentos do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre, RS.

Amostra vegetal

O material de estudo constituiu-se de amostras de cálices de *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco) fresco, safra 2013/2014, adquiridos de um único produtor (coordenadas geográficas 29° 21' 57" S e 50° 48' 57" O) na Feira de Agricultores Ecologistas (FAE) do município de Porto Alegre, RS, Brasil, cultivados sob sistema orgânico, no contexto da agricultura familiar, no bairro Lami do mesmo município. A amostra foi identificada

botanicamente por Marodin S. M. CRBio nº 17268-03D e encaminhada como exsicata para registro no Herbário do Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia da UFRGS, recebendo o registro ICN 165039 (acesso Porto Alegre, RS), vide apêndice A.

Obtenção dos extratos

Para as análises fitoquímicas foram utilizadas as sépalas dos cálices, desprezando os frutos com as sementes. As extrações foram feitas com as sépalas frescas e com as sépalas secas em estufa com circulação de ar à 40 °C por 48 horas.

Foram realizadas duas extrações: alcoolatura e tintura. Foi utilizado álcool etílico de cereais (FARMAQUÍMICA S.A.[®]) a 96 °GL, na alcoolatura a proporção de 400 g de sépalas frescas para 1000 mL e na tintura (hidroalcoolatura) 100 g de sépalas secas para 1000 mL de álcool a 70 °GL. Após um período mínimo de quinze dias de maceração à temperatura ambiente, protegidas da luz, foram filtradas e submetidas à destilação fracionada sob pressão reduzida a 60 °C em sistema de rotaevaporação (FISATON 802D[®]), desprezando-se a porção alcoólica, obtendo-se os extratos etanólicos e os extratos hidroetanólicos, respectivamente, de acordo com o preconizado pela Farmacopéia Brasileira (1987).

Os extratos foram fragmentados em diferentes concentrações (6,25 %, 12,5 %, 25 % e 50 %), e caracterizados quanto aos teores de Polifenóis totais, antocianinas e atividade antioxidante.

Análises Fitoquímicas

Polifenóis Totais

A análise de polifenóis totais foi realizada segundo a metodologia de Vinson et al. (2001) onde 100 µL de amostra de cada extrato, em diferentes concentrações, foram

colocados 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 1,2 M. Os tubos foram colocados em banho-maria a 90 °C por três horas, sendo depois retirados e resfriados a temperatura ambiente e o volume completado a 1 mL com metanol puro (GRUPO QUÍMICO[®], BR). As amostras foram então centrifugadas (Centrifuge 5415R- Eppendorf[®], Alemanha) a 5.000 rpm durante 5 minutos. Os sobrenadantes se constituíram em extratos de polifenóis totais.

A determinação dos teores de polifenóis totais foi realizada através do método Folin-Ciocalteu (MOYER, 2002) sendo que a solução Folin foi preparada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu (Merck[®]) e água deionizada 1:1 (v/v). Em tubo do tipo eppendorf foram adicionados 60 μL dos extratos de polifenóis, acrescidos de 150 μL da solução de Folin deixando reagir por 5 minutos, após os quais foram adicionados 150 μL de carbonato de sódio (20 %) e o volume foi completado com 840 μL de água deionizada. Esta solução foi posta a reagir por 30 minutos e a absorbância lida a 750 nm em espectrofotômetro (UV Mini 1240, Shimadzu[®], Japão) os teores dos polifenóis foram obtidos por interpolação com uma curva padrão construída com soluções de ácido gálico (0, 25, 50, 75, 100, 125 e 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Os resultados foram expressos em miligramas (mg) de equivalentes de ácido gálico (EAG) por 100 g de amostra. Os experimentos foram realizados em três repetições.

Antocianinas totais

As antocianinas totais foram determinadas pelo método de pH diferencial, conforme descrito por Giusti & Wrolstad (2001), em que 200 μg de cada extrato em diferentes concentrações foram adicionados de 1800 μL de dois sistemas-tampão: cloreto de potássio pH 1,0 (0,025 M) e acetato de sódio pH 4,5 (0,4 M) e deixados em repouso

por 15 minutos à temperatura ambiente (25 ± 2 °C) após este período foi feita leitura da absorbância a 540nm e 700nm em espectrofotômetro (UV Mini 1240, Shimadzu®, Japão).

O teor de pigmentos foi calculado de acordo com a equação:

$$\text{Antocianinas monoméricas} = \frac{A \times PM \times FD \times 100}{\epsilon \times m}$$

Onde: A = absorbância = $(A_{\text{max.vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}1,0} - (A_{\text{max.vis}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}4,5}$

PM = peso molecular = 449,2 g/mol; FD = fator de diluição, ϵ = absorvidade molar = 26900 L/(cm x mol), que correspondem à cianidina 3-glicosídeo e m = massa da amostra (g).

Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazil) segundo Brand-Williams et al. (1995) e adaptação de Rufino (2007), consistindo na capacidade de captura do radical livre DPPH pelo antioxidante presente na amostra. Assim, em triplicata, temperatura ambiente e no escuro, em 10 μL do extrato foram adicionados 3,9 ml de solução DPPH a 60 μM e 90 μL de metanol sendo a absorbância lida a 515nm ao final de 15, 30, 45 e 60 minutos. Uma solução controle foi preparada com 100 μL de metanol P.A. adicionando 3,9 ml de solução DPPH. Os experimentos foram realizados em três repetições independentes e os percentuais de inibição antioxidante foram calculados por diferença das absorbâncias da amostra e do branco segundo MELO et al. (2008). O álcool metílico puro foi usado para calibrar o espectrofotômetro.

Análises de minerais

A avaliação mineral foi realizada com as sépalas frescas e secas. Micro e macrominerais foram determinados pelo método espectroscópico de emissão plasma indutivamente acoplado (ICP) que consiste no tratamento da amostra incinerada com HNO₃ e posterior dissolução em HCl (AOAC, 2012).

Para saber se existe diferença significativa entre as variáveis, os dados das avaliações fitoquímicas foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância utilizando o programa estatístico “SAS (*Statistical Analysis System*) for Windows 9.0”, das três repetições. Para avaliação mineral os resultados foram descritos como média \pm desvio-padrão das três repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os conteúdos de compostos fenólicos foram determinados como índice de polifenóis totais representados na Tabela 1, juntamente com os teores de antocianinas.

Observa-se que a medida que a concentração do extrato aumenta, tanto o teor de polifenóis totais quanto o de antocianinas acompanham este crescimento. Isto deve-se provavelmente pela influência do solvente utilizado na concentração destes compostos bioativos.

TABELA 1 - Determinação dos índices de polifenóis totais e antocianinas presentes nos extratos etanólicos e hidroetanólicos de *Hibiscus Sabdariffa* L.

Concentração (%)	Polifenóis totais (mg EAG/100g)		Antocianinas (mg/100g)	
	Extrato etanólico	Extrato Hidroetanólico	Extrato etanólico	Extrato Hidroetanólico
6,25	59,4 \pm 1,8 ^{aA}	128,7 \pm 6,1 ^{aB}	38,5 \pm 9,4 ^{aA}	84,1 \pm 7,6 ^{aB}
12,5	158,2 \pm 10,0 ^{bA}	365,5 \pm 7,6 ^{bB}	75,5 \pm 6,6 ^{bA}	287,2 \pm 22,8 ^{bB}

25	343,4±5,2 ^{ca}	623,9±8,4 ^{cb}	75,9±6,2 ^{ba}	417,6±19,5 ^{cbB}
50	551,3±3,8 ^{da}	710,7±5,3 ^{db}	76,4±6,3 ^{ba}	450,9±16,3 ^{cb}

Médias (\pm Desvio padrão, $n = 3$) com letras minúsculas diferentes sobscritas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os extratos para concentração pela análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$); com letras maiúsculas diferentes sobscritas na mesma linha indicam diferença significativa entre os extratos nas diferentes concentrações analisados pela Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

A análise fitoquímica detectou que o extrato hidroetanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. contém elevados teores de polifenóis totais e antocianinas diferindo-se significativamente ($p \leq 0,05$) quando comparado com o extrato etanólico nas diferentes concentrações.

Analisando cálices de *Hibiscus sabdariffa* Vizzoto et al. (2009) encontraram teores de $478,7 \pm 17,4$ mg EAG/100 g para polifenóis totais. Já Nunes et al. (2014) relataram em seu estudo teores de $672,97 \pm 2,82$ mg EAG/100 g, considerando que estes autores testaram a infusão dos cálices da mesma planta. Estes resultados se assemelham aos deste estudo e demonstram que as formas de extração podem influenciar na quantidade de polifenóis totais.

Quanto ao teor de antocianinas, Ibrahim e Busra (2014) analisando extrato aquoso de cinco diferentes variedades de *Hibiscus sabdariffa*, identificaram teores de antocianinas que variaram de $58,45 \pm 1,64$ a $458,25 \pm 33,33$ mg/100 g. Corroborando com Maciel et al. (2012) que ao testarem extratos alcoólicos dos cálices obtiveram valores de 85,9 mg/100 g. Os valores obtidos para polifenóis e antocianinas nas duas formas de extratos apresentaram valores crescentes similares, quando comparadas as porcentagens, mostrando que ambos são fonte desses fitoconstituintes.

Em estudo realizado por Juliani et al. (2009) foi observado que a quantidade de antocianinas em extrato de cálices de *Hibiscus sabdariffa* pode ter significativa variabilidade. Esses valores foram representados neste trabalho ao analisar diferentes formas de extração a diferentes concentrações. Sendo que estas variações de valores podem provavelmente ocorrer devido ao método aplicado na extração, as diferenças

edafoclimáticas, diversidade genética, das fases de maturação e variedades da planta (CARMO et al., 2011).

As antocianinas, compõe subgrupo de flavonóides, sendo os principais constituintes bioativos de *Hibiscus sabdariffa* L. (TSAI, 2002; MACIEL et al, 2012; IBRAHIM & BUSRA, 2014). Essas substâncias são encontradas principalmente nos cálices, além de estarem presentes nas folhas, assim como outros compostos fenólicos bioativos, sugerindo serem precursores na atividade antioxidante.

Na Tabela 2, estão representados os percentuais de Atividade Antioxidante dos extratos etanólicos e hidroetanólicos de *Hibiscus sabdariffa* a diferentes tempos e concentrações.

TABELA 2 - Percentual da atividade antioxidante dos extratos de *Hibiscus Sabdariffa* L. a diferentes porcentagens dos extratos em diferentes tempos de avaliação.

Concentração	Extrato Etanólico					Extrato Hidroetanólico				
	*T0'	T15'	T30'	T45'	T60'	T0'	T15'	T30'	T45'	T60'
6,2	5,2 ^{aB}	8,8 ^{aA}	8,6 ^{aAB}	10,4 ^{aA}	10,9 ^{aA}	8,5 ^{aB}	14,4 ^{aAB}	17,4 ^{aAB}	18,6 ^{aA}	18,7 ^{aA}
12,5	7,4 ^{bB}	14,1 ^{bA}	15,9 ^{bA}	14,3 ^{bA}	16,7 ^{bA}	10,2 ^{aB}	18,9 ^{aA}	20,9 ^{aA}	22,6 ^{aA}	22,9 ^{aA}
25	11,2 ^{cB}	20,0 ^{cA}	22,2 ^{cA}	22,7 ^{cA}	23,6 ^{cA}	19,5 ^{aC}	35,2 ^{bB}	39,6 ^{bAB}	43,2 ^{bA}	44,7 ^{bA}
50	17,8 ^{dC}	31,3 ^{dB}	35,0 ^{dAB}	36,3 ^{dA}	37,7 ^{dA}	35,9 ^{bB}	66,1 ^{cA}	74,5 ^{cA}	81,1 ^{cA}	84,2 ^{cA}

*Diferentes tempos analisados; Médias ($n = 3$) com letras minúsculas diferentes sobescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre os extratos para o tempo confrontado. Letras maiúsculas diferentes sobescritas na mesma linha indicam diferença significativa em cada extrato nos diferentes tempos analisados pela Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey ($p < 0,05$).

Com relação à atividade antioxidante, os resultados obtidos demonstraram que os valores máximos de inibição de radicais livres para ambos extratos ocorreram ao longo do tempo total de observação (60 min). O percentual de inibição obtido pelo extrato etanólico diferiu significativamente ($p \leq 0,05$) em todas as concentrações avaliadas observando-se o mesmo tempo.

Ressaltando os valores percentuais da atividade antioxidante promovida pelos extratos, destaca-se a ação de sequestro de radicais livres promovida, principalmente, pelo extrato hidroetanólico quando comparado ao etanólico. Isso pode ser explicado pelo fato

do processo de secagem empregado na planta, ter ocasionado a alteração nos teores da concentração de compostos bioativos neste extrato (BORGO et al, 2010).

Em pesquisa feita por Ramos et al (2011), utilizando extrato etanólico a 100% de *Hibiscus sabdariffa*, os percentuais de inibição variaram de 64,04 a 67,71 % ao fim de 30 min de reação, portanto, próximos dos encontrados no presente estudo.

Ao analisar a ação ainda no extrato hidroetanólico, quanto as concentrações, a partir do extrato a 25 %, nota-se que existem diferenças significativa ($p \leq 0,05$) positiva, levando em consideração a maioria dos tempos de reação. A composição química e a estrutura do componente ativo no extrato são fatores importantes que influenciam na eficácia do antioxidante natural (RAMOS et al, 2011). Estes valores percentuais indicam uma capacidade forte de sequestro desses radicais livres por parte do extrato hidroetanólico à concentração de 50 %, sendo que no restante das concentrações dos extratos essa capacidade foi de moderada a fraca. Tendo como classificação a capacidade de sequestro como forte, moderada ou fraca quando o poder de inibição estiver acima de 70 %, entre 50 % a 70 % e abaixo de 50 %, respectivamente (MELO et al, 2008). Nota-se ainda que a partir do tempo 15 min não houve diferença significativa ($p \geq 0,05$), para a concentração de 50 %, quando comparado aos demais tempos, observando uma capacidade de sequestro de radicais livres constante. Mohd-Esa et al (2010) encontraram em seu estudo, usando a mesma espécie, valores superiores para atividade antioxidante aos encontrados na presente pesquisa ($87,9 \pm 0,76$ %) utilizando os cálices da planta, corroborando com os dados obtidos neste estudo.

Nota-se que a habilidade marcadamente de redução do radical livre, possa ocorrer devido alguns autores (RAMOS et al, 2011; ROCHA et al, 2013; IBRAHIM & BUSRA, 2014) utilizarem diferentes concentrações de amostras, concentrações de DPPH, tempos de análise, tipos de solventes e métodos para a realização de análises.

Os resultados obtidos quanto aos teores de minerais estão representados na Tabela 3 pelos macroelementos e microelementos presentes nas sépalas frescas em mg/100 g.

TABELA 3 - Determinação da composição mineral total de sépalas frescas de *Hibiscus Sabdariffa* L.

Elementos	Sépalas frescas	Sépalas secas
	Macroelementos mg/100g	
P	366,67 ±65,06 ¹	3824,16 ±243,68
K	1966,67 ±115,67	20521,28 ±123,09
Ca	930,00 ±65,57	9699,38 ±398,79
Mg	243,33 ±20,82	2537,79±193,42
S	116,67 ±23,09	1216,80 ±103,18
	Microelementos mg/100g	
Cu	0,40 ±0,00	4,17±2,14
Zn	2,50 ±0,40	26,07 ±9,12
Fe	3,93 ±1,80	40,98 ±13,08
Mn	13,13 ±4,66	136,93 ±24,49
B	5,40 ±0,92	56,31 ±11,61

¹Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão das três repetições.

Os minerais estão envolvidos em processos como catálise enzimática de hidrólise ou reações de oxidação e/ou redução. São igualmente importantes no transporte e armazenamento de moléculas menores, tais como oxigênio. Estes elementos de transição e o zinco ligam-se firmemente a macromoléculas, particularmente proteínas (BRAZ-FILHO, 1994).

Avaliando a Tabela 3 pode-se destacar os níveis de K e Ca encontrados em quantidades elevadas, comparando com Sahito et al. (2013) que ao estudar as folhas de *Hibiscus rosa-sinensis* encontraram valores de 3,568 e 678 mg/100g, respectivamente.

Comparando-se os resultados encontrados no presente trabalho com os valores diários recomendados pela RDA (1989) e WHO (1996) para K de 2000, Ca 400 a 500 e Mn de 2 a 3 mg/100g, tanto K, Ca quanto o Mn suprem essas necessidades diárias. Os elementos minerais P, K, Ca, Mg e S possuem funções essenciais na matéria viva. São requeridos como elementos construtores no meio intracelular e, por isso, sua concentração costuma ser elevada, sendo conhecidos como macronutrientes (AMARAL SOBRINHO et al., 1992).

Vale ressaltar também que segundo a Portaria nº27, de janeiro de 1998 da ANVISA (BRASIL,1998) podemos classificar o *Hibiscus sabdariffa* L. como rico em K, Ca e Mn por suprirem mais de 90 % das necessidades diárias recomendadas.

CONCLUSÕES

Este estudo demonstra que os extratos etanólico e hidroetanólico de *Hibiscus sabdariffa* L., a diferentes concentrações dos compostos bioativos, pode ser usado como fonte de polifenóis, antocianinas e antioxidantes naturais.

Comparando-se os resultados obtidos com as necessidades diárias de ingestão desses minerais, recomenda-se a utilização de *Hibiscus sabdariffa* L. como fonte principalmente de K, Ca e Mn como suprimento auxiliar dos referidos nutrientes em alimentos.

REFERÊNCIAS

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC International**. 19th edition. Washington: AOAC, 2012.

ABO-BAKER, A.A. e MOSTADA, G.G. Effect of bio- and chemical fertilizer on growth, sepals yield and chemical composition of *Hibiscus sabdariffa* at new reclaimed soil of South Valley area. **Asian Journal of Science**, 3, p. 16-25. 2011.

AMARAL SOBRINHO, N. M. B.; OLIVEIRA, C.; VELLOSO, A. C. X., Metais Pesados em alguns fertilizantes e corretivos. **Revista Brasileira de Ciência do Solo**, Campinas, 16, p. 271-76, 1992.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Technology**, v.28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. SVS/MS - Ministério da Saúde. Portaria nº 27, de 13 de janeiro de 1998. **Aprova o Regulamento Técnico referente à Informação Nutricional Complementar** (declarações relacionadas ao conteúdo de nutrientes), constantes do anexo desta Portaria. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public>>. Acesso em: 10 Ago. 2014.

BRASIL. Portaria MS nº 33, de 13 de janeiro de 1998. Ingestão Diária Recomendada (IDR) para proteínas, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 16 de janeiro de 1998.

BRAZ-FILHO, R., Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um Pacatubano. **Química Nova**, 17, (5). p. 405-45, 1994.

BORGO, J., XAVIER, C. A. G., MOURA, D. J., RICHTER, M. F., & SUYENAGA, E. S. Influência dos processos de secagem sobre o teor de flavonóides e na atividade antioxidante dos extratos de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers., Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, 20(1), p. 12-17. 2010.

CHEWONARIM T; KINOUCI, T; KATAOKA K; ARIMOCHI H; KUWAHARA, T; VINITKETHUMUEN, U. AND OHNISHI, Y. Effect of rosele (*Hibiscus sabdariffa* L.) a Thai medicinal plant, on the mutagenicity of various known mutagens in *Salmonella typhimurium* and formation of aberrant crypt foci induced by colon carcinogens azoxymethane and 2-amino-1-me-Hyl 6-phenylimidazo (4,5-b) pyridine in F344 rats. **Food Chem. Toxicol**, 37: p. 591-601. 1999.

CARMO, D. D. R. M., FORMAGIO, V. A. S. N., DOFFINGER, C. A. L. C. D., & OLIVEIRA CARNEVALII, R. T. Atividade antioxidante de *Hibiscus sabdariffa* L. em função do espaçamento entre plantas e da adubação orgânica. **Ciência Rural**, 41(8), p. 1331-1336. 2011.

DUANGMAL, K., B. SAICHEUA e S. SUEEPRASAN. Roselle anthocyanins as a natural food colorant and improvement of its colour stability. Proceedings of the AIC 2004 Color and Paints, **Interim Meeting of the International Color Association**, Nov. 2-5, Porto Alegre, Brazil, p: 155-158. 2004.

- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3ªed. São Paulo: Organização Andrei Editora; 1987. 1218p.
- FASOYIRO O.A, ASHAYE A, SAMUEL F.O. Chemical and Storability of Fruit Flavoured (*Hibiscus sabdariffa*) Drink. **World J. Agric. Sci.** 1(2). p. 165-168. 2005.
- GERMANO, P.M.L; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos.** 4ªed. São Paulo: Manole, 2011.1088p.
- GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E., Antocyanins: characterizing and measurement with uv-visible sprectroscopy. In: Wrolstad, R. E. (Ed.) Current protocols in **food analytical chemistry**. New York: John Wiley & Sons, 2001.
- IBRAHIM, R. e BUSRA, N.N. Physico-Chemical Properties and Sensory Acceptance of Juices Made from. Trans. Malaysian Soc. **Plant Physiol.** 22. First Published, 2014.
- JULIANI H.R, WELCH C.R, W.U, Q, DIOUF, B, MALAINY, D, SIMON J.E. Chemistry and Quality of Hibiscus (*Hibiscus sabdariffa*) for Developing the Natural-Product Industry in Senegal. **J Food Sci.**;74(2):p. 113-21. 2009.
- LUZ, F. J. F.; SÁ SOBRINHO, A. F. Vinagreira (*Hibiscus sabdariffa*).In___CARDOSO, M. O. (Coord.) **Hortaliças não-convencionais da Amazônia.** Brasília: EMBRAPA – SPI: Manaus: Embrapa CPAA, p. 63-69. 1997.
- MACIEL, M.J, PAIM, M.P, CARVALHO, H.H.C, WIEST, J.M. Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante. **Rev. Inst. Adolfo Lutz.** São Paulo, 71(3): p. 462-70. 2012.
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J.; **Revista Brasileira de Ciências Farmacológicas**, 44, 193-201. 2008.
- MOYER, R.A.; HUMMER, K. E.; FINN, C. E.; FREI, B.; WROLSTAD, R. E.; **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50, p. 519-525, 2002.
- MOHD-ESA, N., HERN, F. S., ISMAIL, A., & YEE, C. L. Antioxidant activity in different parts of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extracts and potential exploitation of the seeds. **Food Chemistry**, 122(4), p. 1055-1060. 2010.
- NATIONAL RESEARCH COUNSIL. **Recommended Dietary Allowances (RDA)** 10th edn., National Academy of Science, Washington, D.C., 1989.
- NESPOLO, C. R., OLIVEIRA, F. A., PINTO, F. S. T., & OLIVERA, F. C.. **Práticas em Tecnologia de Alimentos.** Porto Alegre: Artmed, 2015, 203p.
- NUNES, S. P., THOMAS, A. B., L. C., & LIMA, O. Compostos fenólicos, antocianinas e atividade antioxidante em chá de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) in____. xxiii congresso de pós-graduação da ufla. 2014.
- PIETTA, P.G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, 63 (7), p. 1.035-1.042, 2000.
- RAMOS, D. D., VIEIRA, M. D. C., FORMAGIO, A. S. N., CARDOSO, C. A. L., CARNEVALI, T. D. O. Antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* L. in function of

spacing between plants and organic fertilization. **Ciência Rural**, 41(8), p. 1331-1336. 2011.

ROCHA, M. S., FIGUEIREDO, R., ARAÚJO, M., & MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Caracterização físico-química e atividade antioxidante (in vitro) de frutos do cerrado piauiense. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, 35, (4), p. 933-941. 2013.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E., BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico 127, MAPA/EMBRAPA**, Fortaleza/Brasil, julho, 2007.

SAHITO, S. B.; KAZI T. G.; JATOI B. W.; Determination and Evaluation of Mineral Constituents of Medicinal Plants used for the Treatment of Asthma and other Ailments by Atomic Absorption Spectrophotometry. **Pak. J. Anal. Environ. Chem.** Vol. 14, (1) p. 61-67. 2013.

SILVA, R. Antioxidant properties and phenol content of *Portulaca oleracea* L. leaf, stems and flowers infusions: health benefits. 2011.

TORRES, E. A. F. S., CAMPOS, N. C., DUARTE, M., GARBELOTTI, M. L., PHILIPPI, S. T., & RODRIGUES, R. S. M.. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 20(2), 145-150. 2000.

TSAI P., MCINTOSH J., PEARCE P., CAMDEN B., JORDAN B. R. Anthocyanin and antioxidant capacity in roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) extract. **Food Research International**, 35, p.351, 2002.

VINSON, J. A.; SU, X.; ZUBIK, L.; BOSE, P.; **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49, p. 5315-21, 2001.

VIZZOTTO, M., CASTILHO, P. M., PEREIRA, M. C. Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante em Cálices de Hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) EMBRAPA **Comunicado Técnico.**; 213:1-7. 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Trace Elements in Human Nutrition and Health**, Geneva, 1996.

5 - ARTIGO 2

Artigo a ser submetido a Revista Ciência Rural

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA DE *Hibiscus sabdariffa* L. E AVALIAÇÃO DA AÇÃO CONSERVANTE COMO ADITIVO CÁRNEO

CHARACTERIZATION PHYSICAL AND CHEMICAL *Hibiscus sabdarriffa* L. AND ACTION AVALIAÇÃO PRESERVATIVE AS ADDITIVE FLESH

Marcelo Pinto Paim^{1*}; Simone Weschenfelder², Heloisa h. C. Carvalho³; José M. Wiest⁴, César A. M. Avancini⁵

^{1,5}Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, Avenida Bento Gonçalves, 9090, CEP 91540-000, Porto Alegre - RS/Brasil

^{2,3,4}Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus do Vale, Avenida Bento Gonçalves, 9500, CEP 91505-970, Porto Alegre - RS/Brasil

*Correspondência: Marcelo Pinto Paim, E-mail: marcelloppaim@yahoo.com.br

RESUMO

Com o objetivo geral de confirmar o uso de *Hibiscus sabdariffa*, por suas características bioativas e nutricionais, como aditivo na composição de produtos alimentares, principalmente em produtos de origem animal, o objetivo específico deste estudo foi determinar as propriedades físico-químicas e atuação sobre a conservação de carne bovina moída de segunda qualidade. O material de estudo constituiu-se de amostra de cálice *Hibiscus sabdariffa* (hibisco), obtida na região metropolitana de Porto Alegre, RS. Foram feitas duas extrações, alcoolatura e tintura, das sépalas frescas e secas, submetidas à análises físico-químicas, e também caracterizadas quanto ao pH e acidez total titulável. Para avaliação microbiológica o modelo carne moída foi acrescido dos extratos para a composição de tratamentos simulando o estudo de vida útil através da

observação de pH e contagem de microrganismos mesófilos, observados por nove dias, sob temperatura de $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Dos resultados em relação a composição físico-química e nutricional destacam-se principalmente os valores das sépalas secas com proteína (7,19 g/100 g), Fibra bruta total (15,59 g/100 g), carboidratos totais (76,26 g/100 g) e baixos valores de lipídios (0,47 g/100 g). Quanto aos valores para o modelo carne, os de pH foram significativamente diferentes do dia zero ao nono dia entre o controle (5,02 e 7,10) e os adicionados com os extratos ($3,96 \pm 0,45$ e $4,11 \pm 0,48$). Com base nas observações pode-se afirmar que as proporções de *Hibiscus sabdariffa* como aditivos cárneos, apresentaram atividade antibacteriana. Dentre os extratos etanólico e hidroetanólico os baixos valores de pH e as quantidades de ácido cítrico sugerem a utilização em sistemas alimentares com vistas a conservação e condimentação.

Palavras-chave: *Hibiscus sabdariffa* (hibisco), Parâmetros físico-químicos, Aditivo cárneo.

ABSTRACT

With the overall objective to confirm the use of *Hibiscus sabdariffa*, by its bioactive and nutritional characteristics, as an additive in the composition of food, mainly in animal products, the specific aim of this study was to determine the physical and chemical properties and performance on the conservation of ground beef second grade. The study material consisted of glass samples *Hibiscus sabdariffa* (hibiscus), obtained in the metropolitan region of Porto Alegre, RS. Two extractions, The alcohol and dye were made of fresh and dried sepals, subjected to physical and chemical analysis, and also characterized for pH and titratable acidity. For microbiological evaluation model was the ground beef plus extracts for the composition treatments simulating the life of study through the pH observation and counting of mesophilic, observed for nine days, at a

temperature of $7^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. The results in relation to physical-chemical and nutritional composition stand out especially the values of dried sepals with protein (7.19 g / 100 g), total Crude fiber (15.59 g / 100 g), total carbohydrates (76.26 g / 100g) and low lipid values (0.47 g / 100 g). As for the values for the meat model, the pH significantly different from zero day to the ninth day of the control (5.02 and 7.10) and added to the extract (0.45 and $3.96 \pm 4.11 \pm 0.48$). Based on the observations it can be said that the *Hibiscus sabdariffa* L. proportions as meat additives, showed antibacterial activity. Among the ethanolic extracts and hydroethanolic low pH values and the amounts of citric acid suggested for use in food systems with a view to preserving and flavoring.

Key words: *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), *Physical and chemical parameters*, *Flesh additive*.

INTRODUÇÃO

A espécie *Hibiscus sabdariffa* L., pertencente à família Malvaceae, é reconhecida principalmente pelos cálices de coloração vermelha. Provavelmente de origem africana, também cultivado na Índia e partes da Ásia, América, Austrália e possivelmente introduzido no Brasil pelos escravos. Conhecida como hibisco, e em alguns estados brasileiros também como quiabo, azedinha, carurú (MG), reselha (BA) e vinagreira (PA, CE, ES) (ESTEVEZ et al., 2014).

De coloração vermelha e sabor azedo, comumente utilizada na medicina tradicional por possuir propriedades bioativas, tais como propriedades antitumoral, anti-inflamatórias, antibacterianas, atuando como diurético, em distúrbios gastrointestinais, doenças do fígado, hipercolesterolemia e hipertensão (MEHDI et al., 2013; MONROY-ORTIZ; CASTILLO-ESPAÑA, 2007).

Devido a tendência mundial voltada ao consumo de produtos naturais, o interesse nestes produtos tem aumentado significativamente (HUCK e WILKES, 1996), extraídos de fontes renováveis, tais como plantas, insetos, algas, etc. Essa tendência ao longo dos anos tem despertado a atenção das indústrias de alimentos e farmacêuticas, as quais começam a vislumbrar a possibilidade de exploração racional de hibisco como matéria-prima para elaboração de alimentos e como fonte natural de corantes (ASOLKAR et al., 1992; DUANGMAL et al., 2004), demonstrando assim um grande potencial econômico.

Na culinária cálices e folhas são utilizados no preparo de picles, sucos e geleias (PASTORE JR., 2011), assim como saladas de alto valor antioxidante, vinho, vinagre, no preparo de doces, xaropes, gelatinas, molhos ou ser consumidos *in natura* (BRUMMITT, 1992; VIZZOTO et al., 2009). Ainda, os extratos vegetais contribuem para a cadeia produtiva de plantas medicinais, os quais quando inseridos na indústria alimentícia servem como aditivos alimentares, insumos na indústria de bebidas e ingredientes industriais para o desenvolvimento de alimentos funcionais (SANTOS et al., 2013).

Admite-se a perspectiva do uso de substâncias naturais presentes nos aditivos naturais utilizados no processamento dos alimentos com a finalidade de conservação (FREIRE et al., 2011), antioxidantes naturais utilizados em hambúrgueres, almôndegas, embutidos, desidratados e cortes marinados tem sido objeto de estudo em diversas pesquisas que empregam matrizes cárneas (MARIUTTI et al., 2008). Além de proporcionar benefícios à saúde, a utilização de plantas aromáticas e condimentares atuam realçando o aroma e sabor dos alimentos, tornando-os mais atrativos aos consumidores (SIMÕES et al., 2007).

O estudo da composição físico-química nas plantas medicinais tem se mostrado bastante relevante, uma vez que as plantas podem ser uma fonte alternativa de compostos energéticos necessários para manter a saúde do corpo (KONIECZYNSKI;

WESOLOWSKI, 2007). Os extratos obtidos a partir dos cálices de hibisco contêm polissacarídeos em boas quantidades, além de ser rico em cálcio, magnésio, ferro, ácidos como o tartárico, málico, cítrico, além de quantidade significativa de fibras alimentares (VISSOTO et al., 2009).

A Ingestão ou Dose Diária Aceitável (IDA) significa a quantidade máxima de substância ou aditivo, que, ingerida diariamente durante a existência do indivíduo, não ofereça risco aparente ou apreciável à saúde, sendo expressa em mg de peso corporal ao dia (PINTO, 2014). Por sua vez, são necessários dados sobre composições de alimentos para que a população possa consumir equilibradamente os nutrientes de acordo com a Ingestão Diária Recomendada (IDR). Essas composições são importantes para inúmeras atividades, como para avaliar o suprimento e o consumo alimentar de um país, verificar a adequação nutricional da dieta de indivíduos e de populações, avaliar o estado nutricional, desenvolver pesquisas sobre as relações entre dieta e doença, em planejamento agropecuário, na indústria de alimentos, além de outras (JUNIOR et al, 2005; LACERDA et al, 2013). Neste propósito estudos desenvolvidos por instituições internacionais como “*Food and Drug Administration (FDA)*” e o “*Codex Alimentarius (FAO/OMS)*”, definem e recomendam o uso de substâncias como os Aditivos alimentares a serem utilizados na formulação de alimentos (PINTO, 2014).

Com o objetivo geral de confirmar o uso de *Hibiscus sabdariffa*, por suas características bioativas e nutricionais, como aditivo na composição de produtos alimentares, principalmente em produtos de origem animal, o objetivo específico deste estudo foi determinar as propriedades físico-químicas e sua atuação sobre a estabilidade de carne bovina moída de segunda qualidade, para amostras obtidas na região metropolitana de Porto Alegre, RS.

MATERIAL E MÉTODOS

O experimento foi desenvolvido nos laboratórios de higiene de alimentos e bromatologia do Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA) da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre, RS.

O material de estudo constituiu-se de amostras de cálices *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco) fresco, safra 2013/2014, adquiridos de um único produtor (coordenadas geográficas 29° 21' 57" S e 50° 48' 57" O) na Feira de Agricultores Ecologistas (FAE) do município de Porto Alegre, RS, Brasil, cultivados sob sistema orgânico, no contexto da agricultura familiar, no bairro Lami do mesmo município. A amostra foi identificada botanicamente e encaminhadas como exsiccatas para registro no Herbário do Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia da UFRGS, recebendo os registros ICN 165039 (acesso Porto Alegre, RS).

Para as análises físico-químicas, foram utilizadas as sépalas dos cálices, desprezando os frutos com as sementes. As extrações foram feitas com as sépalas frescas e com as sépalas secas em estufa com circulação de ar à 40 °C por 48 horas.

Foram feitas duas extrações: alcoolatura e tintura. Foi utilizado álcool etílico de cereais (Farmaquímica®, Porto Alegre) a 96 °GL, na alcoolatura a proporção de 400 g de sépalas frescas para 1.000 mL e na tintura (hidroalcoolatura) 100 g de sépalas secas para 1000 mL de álcool a 70 °GL. Após quinze dias de maceração, foram filtradas e submetidas à destilação sob pressão reduzida em sistema de rotaevaporação, desprezando-se a porção alcoólica, obtendo-se os extratos etanólicos e os extratos hidroetanólicos, respectivamente, de acordo com Farmacopéia (1987).

As sépalas frescas e secas, e os extratos etanólico e hidroetanólico foram submetidos a análises físico-químicas para os seguintes parâmetros: lipídios por extração com éter etílico, em aparelho de Soxhlet; cinzas obtidas por incineração de uma

quantidade conhecida da amostra, em forno mufla a 550 °C, até obtenção de peso constante; umidade e umidade residual, determinada pela secagem em estufa a 105 °C e proteínas pelo método Micro-Kjeldahl (utilizando-se o fator 5,75, recomendado para proteínas de vegetais). A fibra bruta total foi determinada pelo método de resíduo orgânico insolúvel aplicável as partes da planta e extratos, após uma digestão ácida e outra alcalina (AOAC, 2012). Os carboidratos (CHO) totais foram analisados por diferença (BRASIL, 2003), calculados de acordo com a seguinte fórmula: % CHO totais = 100% - (% umidade + % proteínas + % lipídios + % cinzas totais + % fibras alimentares). A energia em quilocalorias (kcal) foi calculada pela multiplicação dos teores de CHO totais, proteínas e lipídios pelos fatores 4,4 e 9 (kcal/g), respectivamente. A energia em quilojoules (kJ) foi determinada pela multiplicação da energia em kcal pelo fator 4,2 (CARVALHO et al., 2002).

Os extratos foram fragmentados em diferentes concentrações (6,25 %, 12,5 %, 25 % e 50 %), e caracterizados quanto ao pH e a acidez total titulável (ATT). A ATT com solução padrão de NaOH 0,1N e o resultado expresso em gramas de ácido cítrico/100g e ml gastos NaOH 0,1N %; o pH foi determinado por leitura direta pelo método potenciométrico, com peagâmetro (AB15 pH meter Accumet®), previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 7,0 (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008).

A amostra de carne bovina moída de segunda qualidade utilizada foi adquirida, na condição de consumidor, em um estabelecimento varejista do município de Porto Alegre, RS.

A amostra cárnea, foi acrescida dos extratos na concentração de 50 % constituindo os seguintes tratamentos: Tratamento Controle - sem adição de extrato; T1 - 20 % de extrato etanólico; T2 - 30 % de extrato etanólico; T3 - 20 % do extrato hidroetanólico e T4 - 30 % do extrato hidroetanólico de *Hibiscus sabdariffa*. Nestes Tratamentos a carne

foi acondicionada em frascos de vidro e homogeneizados manualmente por um tempo total de 2 minutos, totalizando 3 frascos de 200 g por tratamento.

Simulando o estudo da vida útil esses tratamentos foram observados nos tempos 0, 1, 2, 3, 6 e 9 dias, à temperatura de $7\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, através dos indicadores pH e contagem de microrganismos mesófilos aeróbios.

O pH foi determinado segundo metodologia descrita por AOAC (2012), na qual 10 gramas da amostra, foram homogeneizadas com 100 mL de água destilada. A medida do pH foi determinada em triplicata, em potenciômetro (pH meter pH-208[®]), utilizando eletrodo de vidro, inserido no centro da amostra cárnea, sendo previamente calibrado com pH 4,0 e pH 7,0.

Na contagem total de bactérias mesófilas aeróbias segundo Brasil (2003) foram semeadas a partir das diluições 10^{-1} até 10^{-6} , em duplicata, 1 mL em placas de Petri estéreis utilizando-se a técnica de semeadura em profundidade *Pour plate*, empregando-se o meio PCA (OXOID[®]) previamente fundido e mantido em banho Maria (DELEO[®]) a 46 °C . As placas foram homogeneizadas no sentido horário e anti-horário para a distribuição uniforme do crescimento das colônias e, após solidificação, incubadas em posição invertida a $36 \pm 1\text{ °C}$ por 48 horas para contagem de mesófilos. Após o devido período foram contadas todas as colônias, em placas que continham entre 20 e 200 colônias. O resultado foi o número de colônias contadas multiplicado pela diluição, expresso em UFC/g⁻¹.

Para saber se houve diferença significativa entre as variáveis, os dados da avaliação físico-química foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de significância utilizando o programa estatístico “SAS (*Statistical Analysis System*) para *Windows 9.0*”.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os valores médios dos parâmetros físico-químicos e valores energéticos, realizados nas sépalas frescas e secas, e nos extratos etanólico e hidroetanólico de hibisco, obtidos a partir da média dos valores estão apresentados na Tabela 1.

Na caracterização das sépalas frescas e secas, a média de proteína (g/100 g) foi de 0,76 e 7,19, respectivamente, diferindo significativamente entre si ($p < 0,05$). Esta diferença pode ser explicada pela concentração de proteína no produto seco. Não foram detectados valores nos extratos quanto a este parâmetro. JUNG & KIM (2013) que analisaram o pó de hibisco e encontraram teores de proteínas de 7,17 g/100 g, valores semelhantes ao encontrado no presente estudo para a sépala seca do hibisco. A proteína bruta deste estudo foi em média 6% superior aos valores relatados por SHRAWAN et al. (2011).

A quantidade de lipídios estimada nos extratos diferiram significativamente entre si ($p < 0,05$) em relação as sépalas frescas e secas. Sendo que o extrato etanólico apresentou a menor quantidade de lipídios, estando inferior aos valores encontrados pela pesquisa de JUNG & KIM (2013), onde o valor constatado foi de 0,77 g/100 g. Os baixos teores de lipídios constatados nas sépalas e seus respectivos extratos, sugere seu emprego pela indústria alimentícia para alimentos saudáveis e de baixo conteúdo calórico concordando com OLIVEIRA et al. (2013) que estudaram alternativas para formulações de produtos cárneos mais saudáveis.

O teor de umidade encontrado nas sépalas secas 8,15 g/100 g foi próximo ao encontrado por ELHASSAN et al. (2014) em estudo realizado para padronizar a matéria prima vegetal quanto a características de pureza, descrevendo o conteúdo de umidade não superior a 8,5%. Os valores encontrados na presente pesquisa foram inferiores aos encontrado por ABOU-ARAB et al. (2011) e CID-ORTEGA & GUERREIRO-

BELTRAN (2014) que foram de 12,81 % e 9,18 a 9,25 g/100 g, respectivamente, para umidade do pó dos cálices. O teor de umidade das plantas medicinais e/ou condimentares afeta a qualidade e segurança dos alimentos, uma vez que o maior teor de umidade presente pode resultar na deterioração e diminuição do tempo de prateleira (ELHASSAN et al., 2014).

Após a incineração das sépalas frescas e secas, e os extratos, as sépalas secas apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) maior quanto ao valor obtido de cinzas totais de 6,44 g/100 g. Estes valores apresentam-se inferiores aos dados de ABOU-ARAB et al. (2011) e ASHAYE (2013) em 11,24% e 8,97 %, respectivamente. Tais diferenças, entre umidade e cinzas totais, podem ser atribuídas às condições (tempo e temperatura) de secagem empregados nas sépalas, ou ainda devido à fonte da amostra (AMEH et al., 2009).

Quanto aos teores de fibra bruta e carboidratos totais obtidos por diferença, houve diferença significativa ($p < 0,05$) na planta analisada. Esses teores foram elevados para as sépalas secas 15,59 e 76,26 g/100 g, respectivamente. Essas quantidades foram superiores quando comparadas às descritas por ABOU-ARAB et al. (2011) que encontraram 11,17 % de fibra bruta e 69,62 % de carboidratos totais por diferença em cálices secos de hibisco. A composição dos cálices secos referenciados, apresentou algumas diferenças que podem ser devido aos fatores abióticos naturais como variedade genética e tipo de solo (CATHERINE & PACKER, 2003). Tendo em vista a considerável concentração de fibra nos cálices secos, RODRÍGUEZ et al. (2006) relataram a eficiência das fibras alimentares para o gerenciamento da função do intestino, a partir de sua integridade e função absorviva, manutenção da barreira intestinal e a normalização da microflora intestinal. De acordo com ARAÚJO et al. (2009), as propriedades funcionais das fibras

são determinadas pela inter-relação entre estruturas e características físico-químicas do vegetal.

TABELA 1 - Valores médios (g/100g) dos parâmetros físico-químicos das sépalas e de extratos de sépalas de *Hibiscus sabdariffa* L..

Parâmetros Físico-químicos	Sépalas		Extratos	
	Fresca	Seca	Etanólico	Hidroetanólico
Proteína ±DP	0,76 ±0,10 ^{B1}	7,19 ±0,35 ^A	nd ²	nd
Lipídios ±DP	0,42 ±0,03 ^B	4,7 ±0,05 ^B	0,10 ±0,02 ^C	0,67 ±0,03 ^A
Umidade ±DP	85,00 ±0,66 ^B	8,15 ±0,91 ^C	94,50 ±0,66 ^A	89,86 ±0,77 ^{AB}
Cinzas ±DP	0,70 ±0,06 ^B	6,44 ±0,42 ^A	0,38 ±0,12 ^B	0,64 ±0,06 ^B
FT ³	1,49 ±0,00 ^B	15,59 ±0,04 ^B	-	-
CHO ⁴	3,39 ±2,01 ^A	76,26 ±0,75 ^B	-	-
VET ⁵ (kcal/100g)	20,35 ±7,35 ^A	338,00 ±3,50 ^B	-	-
VET ⁶ (kJ/100g)	85,48 ±30,87 ^A	1419,60 ±14,69 ^B	-	-

¹Valores na linha, seguidas de mesma letra, não diferem entre si (P>0,05) pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; ²Valores não detectados; Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão (DP) das triplicatas; ³FT= fibra total; ⁴CHO= carboidratos totais por diferença; ⁵VET= valor energético total médio em kcal/100g; ⁶VET= valor energético total médio em kJ/100g. – Não aplicável.

Ao avaliar-se os extratos obtidos, em diferentes concentrações (6,25%, 12,5%, 25% e 50%), quanto ao pH e acidez total titulável (ATT) e obtiveram-se os resultados descritos na Tabela 2.

Na caracterização dos extratos etanólico e hidroetanólico, os valores de pH apresentaram-se semelhantes para ambos extratos, nas concentrações aplicadas, não diferindo significativamente entre si (p>0,05). O valor médio de pH obtido foi 2,41 e 2,49 para o extrato etanólico e hidroetanólico, respectivamente. Estes valores estão de acordo com JUNG et al. (2013) que constatou o índice de 2,49. Porém pouco maior que os valores 2,16 a 2,17 obtidos por CID-ORTEGA & GUERREIRO-BELTRAN (2014).

Os valores de ATT indicaram diferença significativa (p<0,05), entre os extratos e as concentrações. Observa-se que a medida que a concentração dos extratos aumenta a quantidade de ácido cítrico acompanha esta tendência.

TABELA 2 - Características físico-químicas dos extratos etanólico e hidroetanólico *Hibiscus sabdariffa* L. em diferentes concentrações.

Extratos (%)	Características Físico-químicas		
	pH	ATT (g de ácido cítrico/100g)	ATT (ml NaOH 0,1N%)
Extrato Etanólico	6,25	2,57 ^{a1} ±0,15	0,19 ^a ±0,03
	12,5	2,37 ^a ±0,02	0,35 ^b ±0,05
	25	2,31 ^a ±0,07	0,66 ^c ±0,07
	50	2,40 ^a ±0,02	1,26 ^d ±0,05
Extrato Hidroetanólico	6,25	2,56 ^a ±0,02	0,54 ^e ±0,02
	12,5	2,47 ^a ±0,09	0,81 ^f ±0,03
	25	2,49 ^a ±0,09	1,54 ^g ±0,02
	50	2,45 ^a ±0,17	3,05 ^h ±0,05

¹Valores na coluna, seguidas de mesma letra, não diferem entre si (P>0,05) pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade; Os resultados são expressos como média ± desvio-padrão (DP) das triplicatas.

O comportamento do pH nas unidades experimentais cárneas contendo extratos etanólico e hidroetanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. na concentração de 50%, pode ser visualizado na Tabela 3.

Quando analisado comportamento do Tratamento Controle, observa-se, quanto ao período de armazenamento (dia 9), o aumento de pH, o que se assemelha aos estudos de CONCEIÇÃO & GONÇALVES (2009) e ARREGUY BAPTISTA et al. (2013) que avaliando carnes moídas, encontraram pHs superiores a 6,5, ou seja, impróprias para o consumo.

Até a 3^a verificação houve diferença estatística significativa (p<0,05), entre todos os tratamentos levando-se em consideração as proporções de extratos utilizadas. Sendo que é possível notar que ao 9^o dia ambos tratamentos destoaram do tratamento controle, permaneceram com o pH ao redor de 4,0. Esses parâmetros podem ser associados a característica de conservação, visto que o pH influencia na velocidade das reações

enzimáticas e no desenvolvimento de microrganismo segundo apontam NESPOLO et al. (2015). Concordando com TERRA & BRUM (1998), pHs acima de 6,4 apontam o início do processo de decomposição da carne.

Conforme os resultados obtidos, após o emprego dos extratos como aditivo cárneo, notam-se que o Tratamento T4 destaca-se significativamente ($p < 0,05$), ao longo das verificações. Sendo que as medidas de pH ficaram compreendidas entre 3,51 a 3,63, relativamente menores aos valores 5,31 a 6,08 obtidos por STEFANELLO et al. (2015) que utilizaram o extrato hidroetanólico de cogumelo do sol (*Agaricus blazei* Murril) em tratamentos com carne suína. Observaram ser efetivo quanto a diminuição do pH para todos os tratamentos, quando adicionado na concentração de 2,0 %, contribuindo com a conservação do alimento estendendo sua vida útil.

Ainda ao se observar a Tabela 3, analisou-se a evolução dos microrganismos mesófilos aeróbios durante o período de armazenamento das unidades experimentais cárneas.

Verifica-se que no início da análise, dia zero, todos os Tratamentos com exceção do T4 apresentaram uma contagem inicial de bactérias mesófilas aeróbias semelhante, $\geq 1 \times 10^6$ UFC/g⁻¹. Quanto ao período de armazenagem, somente na 4ª verificação foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) quanto ao crescimento de microrganismos mesofilos aeróbios entre os extratos em relação ao controle. Embora a legislação brasileira (BRASIL, 2001) não estabeleça limites de tolerância para o grupo de microrganismos mesófilos aeróbios, populações elevadas desse grupo representa qualidade higiênico-sanitária deficiente, muitas vezes por má qualidade da matéria-prima aliada a tempo e temperatura de estocagem inadequados. Quando populações de bactérias mesófilas ultrapassam 10^6 UFC/g, a vida de prateleira deste produto torna-se comprometida (FORSYTHE, 2013). Assim, corroborando com KOBELITZ (2011)

analisando as contagens de bactérias mesófilas, é interessante notar que ambos extratos foram eficazes até o 6º dia de armazenamento a temperatura de refrigeração a $7\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, significativamente diferentes do controle que a partir do 3º dia de verificação se torna impróprio para consumo.

Levando-se em consideração os diferentes extratos, etanólico e hidroetanólico, é possível observar que não existe diferença significativa entre esses aditivos quanto aos seus efeitos antibacterianos, notando-se diferenças entre as proporções empregadas desses extratos. Analisando estes resultados, pode-se afirmar que o processo de secagem contribui com a armazenagem da planta visando sua posterior utilização (BADKE et al., 2011) devendo-se, durante este processo, evitar alterações consideráveis, como temperatura, nos princípios ativos do vegetal.

Destaca-se menores contagens, em valores absolutos, para o tratamento T2 que foi mais eficiente na inibição dos mesófilos aeróbios. Este maior efeito antibacteriano pode ser observado nas amostras cárneas aditivadas com proporções mais elevadas de extrato. Sugerindo, ser o fator limitante, para a conservação da carne moída de segunda qualidade. Estudando o efeito antibacteriano de extratos vegetais de espécies de hortelã, ROCHA et al. (2014) observaram que houve diferenças significativas em relação às maiores proporções de extrato, que reduziram significativamente a taxa de crescimento promovendo a inibição relativa do desenvolvimento bacteriano. Esta inibição foi diretamente proporcional às concentrações utilizadas, concordando com NASCIMENTO et al. (2013).

Embora possam ser encontrados na literatura alguns relatos descrevendo a eficiência antibacteriana dos recursos naturais (plantas) frente a agentes patogênicos e/ou deteriorantes em alimentos, a nosso conhecimento, a ação dos extratos etanólicos e

hidroetanólicos de *Hibiscus sabdariffa* em produtos cárneos não foi anteriormente documentada.

TABELA 3 - Valores de pH e contagem dos mesófilos aeróbios de tratamentos contendo carne bovina moída com extratos de *Hibiscus sabdariffa* L. a 50 %.

		Período em dias					
Testes	Tratamentos	0	1	2	3	6	9
pH	Controle	5,02 ^{aA}	5,22 ^{aB}	5,06 ^{aA}	5,04 ^{aA}	6,08 ^{aC}	7,10 ^{aD}
	T1	4,45 ^{bA}	4,63 ^{bB}	4,24 ^{bC}	4,32 ^{bD}	4,35 ^{bD}	4,36 ^{bD}
	T2	4,03 ^{cA}	4,35 ^{cB}	4,13 ^{cC}	4,14 ^{cC}	4,20 ^{cC}	4,31 ^{bB}
	T3	3,86 ^{dA}	3,90 ^{dA}	3,90 ^{dA}	4,13 ^{cB}	4,09 ^{dB}	4,14 ^{cB}
	T4	3,51 ^{eA}	3,59 ^{eAC}	3,57 ^{eAC}	3,79 ^{dB}	3,72 ^{eBC}	3,63 ^{dC}
Mesófilos UFC/g	Controle	5,4x10 ^{6aA}	6,3x10 ^{6aB}	7,3x10 ^{6aC}	1,0x10 ^{7aD}	2,0x10 ^{7aE}	7,3x10 ^{7aF}
	T1	3,3x10 ^{6aA}	1,7x10 ^{6aB}	1,6x10 ^{6aB}	1,6x10 ^{6abB}	1,6x10 ^{6abB}	2,1x10 ^{6aB}
	T2	2,7x10 ^{6aA}	1,1x10 ^{6aB}	1,0x10 ^{6aB}	4,9x10 ^{5bC}	5,5x10 ^{5bC}	1,0x10 ^{6aB}
	T3	1,5x10 ^{6aA}	1,8x10 ^{6aA}	1,1x10 ^{6aA}	3,9x10 ^{6abB}	3,2x10 ^{6abB}	2,9x10 ^{7aC}
	T4	9,0x10 ^{5aA}	6,8x10 ^{5aB}	2,2x10 ^{6aC}	2,2x10 ^{6abC}	2,9x10 ^{6abC}	2,0x10 ^{6aC}

T1 (80:20% Extrato etanólico); T2 (70:30% Extrato etanólico); T3 (80:20% Extrato Hidroetanólico) e T4 (70:30% Extrato Hidroetanólico). Valores correspondentes a média de três repetições. Letras minúsculas diferentes sobscritas na mesma coluna indicam diferenças significativas entre o tratamento em relação aos diferentes. Letras maiúsculas diferentes sobscritas na mesma linha indicam diferença significativa entre os tratamentos em relação a cada dia para a análise de variância (ANOVA) e teste de Tukey (<0,05).

CONCLUSÕES

Ao que se refere à composição físico-química, as amostras de *Hibiscus sabdariffa* L. apresentaram valores relevantes do ponto de vista nutricional, destacando-se a sépalas secas quanto aos altos teores de proteína, fibras e carboidratos totais e os baixos teores de lipídios.

Dentre os extratos etanólico e hidroetanólico os baixos valores de pH e as quantidades de ácido cítrico sugerem a utilização em sistemas alimentares com vistas a conservação e condimentação.

Assim, os resultados obtidos indicam a viabilidade técnica do uso de extratos de *Hibiscus sabdariffa* para prolongar a vida de prateleira do modelo cárneo proposto.

REFERÊNCIAS

- ABOU-ARAB, A. A.; ABU-AALEM, F. M.; e ABOU-ARAB, E. A., Physico-chemical properties of natural pigments (anthocyanin) extracted from Roselle calyces (*Hibiscus sabdariffa*). **Journal of American Science**, v. 7, p. 445-456, 2011.
- AMED, A. O.; ISA, M. T.; AHMED, A. S.; ADAMU, S. B., Studies on the use of trona in improving the taste of the extract from *Hibiscus sabdariffa* calyx. **Nigeria J. of Pharmaceutical Sci.** v.8 , p.7-12, 2009.
- AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the AOAC International**. 19th edition. Washington: AOAC, 2012.
- ARAÚJO, E. M. de; MENEZES, H. C. de; TOMAZINI, J. M., Fibras solúveis e insolúveis de verduras, tubérculos e canela para uso em nutrição clínica. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** v29, p. 401-406, 2009.
- ASHAYE, O. A, Studies on moisture sorption isotherm and nutritional properties of dried Roselle calyces, **International Food Research Journal**, v. 20, p. 509-513, 2013.
- ASOLKAR, L. V.; KAKKAR, K. K.; CHAKRE, O. J., (Second Supplements to Chopra, s Glossary of Indian Medicinal Plants with Active Principles Part 1 (A-K). **Council of Scientific and Industrial Research**, New Delhi, Índia, p. 44, 1992.
- BADKE, M. R., BUDÓ, M. D. L. D., SILVA, F. M. D., & RESSEL, L. B.. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Esc. Anna Nery**, v. 15, p. 132-9, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Regulamento Técnico sobre Rotulagem de Alimentos Embalados: Resolução - RDC n° 360, de 23 de dezembro de 2003. **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, Brasília, DF, 2003.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RDC n°12 de janeiro de 2001. **Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm> Acesso em: 10 ago. 2014.
- BRUMMITT, R. K., **Vascular plant families and genera**. Kew: Royal Botanic Gardens, 1992. 804p.
- CATHERINE, A. R.; PACKER, L., **Flavonoids in health and disease**. 2.ed. New York: Basel, copyright, 2003.
- CARVALHO, H. H.; JONG, E. V. de; BELLÓ, R. M.; et al., **Alimentos: Métodos físicos e químicos de análise**. Porto Alegre: Ed. Universidade/UFRGS, 2002, 180p.
- CID-ORTEGA, S.; GUERRERO-BELTRAN, J. A., Roselle Calyces Particle Size Effect on the Physicochemical and Phytochemicals Characteristics. **Journal of Food Research**, v. 3, p.83-94, 2014.

CONCEIÇÃO, F. V. E. D., GONÇALVES, E. C. B. A. Qualidade físico-química de mortadelas e carnes moídas e conhecimento dos consumidores na conservação destes produtos. **Ciênc Tecnol Aliment**, 29(2), p. 283-90, 2009.

DE ARREGUY BAPTISTA, R. I. A., DE MOURA, F. M. L., FERNANDES, M. F. T. S., SANTOS, V. V. M., & FERNANDES, E. F. T. S. Aspectos qualitativos da carne moída comercializada na região metropolitana do recife-pe. **Acta Veterinaria Brasilica**, 7(1), p.38-47. 2013.

DOS SANTOS, B. S.; BARRETTO, L. C. D. O.; DOS SANTOS, J. A. B.; et. al., Obtenção, liofilização e caracterização de extrato de capim-limão (*Cymbopogon citratus* DC) e hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.). **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 3, p. 90-99, 2013.

DUANGMAL, K.; SAICHEUA, B.; SUEEPRASAN, S., Roselle anthocyanins as a natural food colorant and improvement of its color stability. Proceedings of the AIC Color and Paints, **Interim Meeting of the International Color Association**, 2004, IEEE Xplore, p: 155-158, 2004.

ELHASSAN, E. H. A. R.; AHMMED E. M.; e SIRAG N., Standardization of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.) Calyx cultivated in Sudan. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, p. 217-222, 2014.

ESTEVES, G. L.; DUARTE, M. C.; TAKEUCHI, C. Sinopse de Hibiscus L. (Malvoideae, Malvaceae) do Estado de São Paulo, Brasil: espécies nativas e cultivadas ornamentais. **Hoehnea**, v. 41, p. 529-539, 2014.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3ªed. São Paulo: Organização Andrei Editora; 1987. 1218p.

FORSYTHE, S. J., **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2ª Ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2013. 607p.

FREIRE, J.M; CARDOSO, M.G; BATISTA, L.R; et al., Controle microbiológico de alimentos utilizando óleo essencial de *Pimpinella anisum* (erva-doce). **Higiene Alimentar**, v.25, p.154-158, 2011.

HUCK, P.; WILKES, M. C., **Beverage natural colours: Chemistry and application. Proceedings of the International Congress and Symposium on Natural Colourants**, Mexico, p. 11, 1996.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas, métodos químicos e físicos para análises de alimentos**. 4ª ed. 1ª ed. Digital, São Paulo 2008. 1020 p.

JUNG E.K; KIM Y.J; JOO N., Physicochemical properties and antimicrobial activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **J. Sci. Food Agric**. v. 93, p.3769-3776, 2013.

KOBLITZ, M. G. B. **Matérias-primas alimentícias: composição e controle de qualidade**. Guanabara Koogan, 2011, 301p.

- KONIECZYNSKI, P.; WESOŁOWSKI, M., Total phosphorus and its extractable form in plant drug. Interrelation With Selected Micro-and Macroelements. **Food Chem.** p. 103, 210, 2007.
- MEHDI A.; TOUBA E.; ZARRIN S.; TAHEREH E.; An overview of the roselle plant with particular reference to its cultivation, diseases and usages. **Eur. J. of Med. Pl.** v. 3, p.135-145, 2013.
- MARIUTTI, L.R.B.; ORLIEN, V.; BRAGAGNOLO, N.; et. al., Effect of sage and garlic on lipid oxidation in high-pressure processed chicken meat. **Eur. Food Res. and Tech.**, v. 227, p.337-344, 2008.
- MONROY-ORTIZ, C., CASTILHO-ESPAÑA, P., **Plantas Medicinales Utilizadas em el Estado de Moretos.** UAEM, México, 2007, 286 p.
- NASCIMENTO, J. M., SERRA, A. P., BACCHI, L. M., GAVASSONI, W. L., & VIEIRA, M. C. Inibição do crescimento micelial de *Cercospora calendulae* Sacc. por extratos de plantas medicinais. **Rev. Bras. Pl. Med**, v. 15(4 supl I), p. 751-756, 2013.
- NESPOLO, C. R., DE OLIVEIRA, F. A., PINTO, F. S. T., OLIVERA, F. C. **Práticas em Tecnologia de Alimentos.** Porto Alegre: Artmed, 2015, 203p.
- OLIVEIRA, D. F. de et al., Alternativas para um produto cárneo mais saudável: uma revisão. **Braz. J. Food Technol.** v. 16, p. 163-174, 2013.
- PASTORE JR. F., **Plantas da Amazônia: 450 espécies de uso geral.** Universidade de Brasília, Biblioteca Central, 2011, 3140 p.
Disponível em: <<http://www.ittorolac.org>> Acesso em 10 de Jul. de 2014.
- PINTO, P. S. DE A.; **Inspeção e Higiene de Carnes.** 2ª Ed. Viçosa: Editora UFV, 2014, 389 p.
- ROCHA, T. J. M., FREITAS, R. C., AZEVEDO, R. R. D. S., SOUZA, L. I. O., & SANTOS, A. F. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante das espécies *Plectranthus amboinicus* (Lour.) e *Mentha x villosa* (Huds.). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 35, p. 113-118, 2014.
- RODRÍGUEZ, R.; JIMÉREZ, A.; FERNÁNDEZ-BOLAÑOS, J.; et al., Dietary fibre from vegetable products as source of functional ingredients. Trends in **Food Science & technology**, Oxford, v. 17, p. 3-15, 2006.
- SAS INSTITUTE. Statistical analysis system user's guide. Version 9.0. Cary: SAS Institute, 2002. 513p
- SIMÕES, C. M. O. et al., Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 1104 p.
- SHRAWAN S; SINGH D.R; SALIM K.M; et al., Estimation of proximate composition, micronutrients and phytochemical compound sintradition alvegetables from Andaman and NicobarI slands. **Int J. Food Sci. Nutr.** v. 62, p.765-773, 2011.

STEFANELLO, F. S., CAVALHEIRO, C. P., LUDTKE, F. L., SILVA, M. D. S., FRIES, L. L. M., & KUBOTA, E. H. Efeito da adição de extrato de cogumelo do sol em linguiça suína e avaliação da estabilidade oxidativa e microbiológica do produto. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 36, p. 171-186, 2015.

TERRA, N. N.; BRUM, M. A. R. **Carne e seus derivados. Técnicas de controle de qualidade**. São Paulo: Nobel, 1988, 21-23 p.

VIZZOTTO, M., CASTILHO, P. M., PEREIRA, M. C. Compostos Bioativos e Atividade Antioxidante em Cálices de Hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) EMBRAPA **Comunicado Técnico.**; 213:1-7. 2009.

6- ARTIGO 3

Artigo submetido a Revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia
(*Brazilian Journal of Veterinary and Animal Sciences*)

Potencial antibacteriano dos extratos de hibisco e sua aplicação como aditivo cárneo

[*Antibacterial potential of hibiscus extracts and their application as meat additive*]

Marcelo Pinto Paim*¹, Simone Weschenfelder², José M. Wiest², César A. M. Avancini¹

⁽¹⁾ Faculdade de veterinária - UFRGS. *E-mail: marcelloppaim@yahoo.com.br

⁽²⁾ Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos - UFRGS.

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antibacteriano dos extratos etanólico e hidroetanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. a diferentes concentrações e sua aplicação como aditivo alimentar sobre a estabilidade de carne moída bovina. Nas análises microbiológicas, foram utilizadas as sépalas dos cálices, secas e frescas, para as extrações. Foram desafiados *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* padrões. Para a determinação da atividade antibacteriana, *in vitro*, foi utilizado o teste de diluição com base na técnica do sistema de tubos múltiplos. A amostra de carne, foi elaborada com diferentes concentrações dos extratos vegetais e posteriormente inoculadas com as bactérias, preparadas nas densidades populacionais de 10^4 a 10^8 UFC.mL observando-se o efeito antibacteriano. A amostra foi observada também quanto aos parâmetros de pH e contagem de microrganismos mesófilos. Os testes *in vitro*, considerando-se os inóculos padrões, acarretaram efeito antibacteriano homogêneo com relação a concentrações e os tempos de contato, assim como a redução das densidades populacionais bacterianas. Há o declínio de pH e estabilidade na multiplicação dos microrganismos mesófilos. A utilização dos extratos de hibisco, em diferentes proporções, assegura a qualidade microbiológica por seu efeito benéfico como aditivo cárneo.

Palavras-chave: *Hibiscus sabdariffa* L., microrganismos deteriorantes e patogênicos, vida de prateleira.

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the antibacterial effect of ethanol extracts of *Hibiscus sabdariffa* L. and hydroethanolic at different concentrations and its use as a food additive on bovine ground meat stability. Microbiological analysis, the sepals of the chalice were used, dry and fresh for the extractions. They were challenged

Staphylococcus aureus and *Escherichia coli* standards. For the determination of the antibacterial activity in vitro, we used the dilution test based on the technique of multiple tube system. The meat sample was made with different concentrations of plant extracts and subsequently inoculated with the bacteria prepared at densities 10^4 at 10^8 UFC.mL observing the antibacterial effect. The sample was also observed as the pH parameters and mesophilic count. In vitro tests, considering the standard inoculum, resulted homogeneous antibacterial effect with respect to concentrations and contact times, as well as the reduction of bacterial population densities. There is the decline of pH and stability in the multiplication of mesophilic. The use of hibiscus extract, in different proportions, ensures the microbiological quality for its beneficial effect as meat additive.

Keywords: *Hibiscus sabdariffa* L., spoilage and pathogenic microorganisms, shelf life.

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais no Brasil emerge como uma alternativa terapêutica, consideravelmente influenciada pelos povos indígenas, pelas tradições africanas e pela cultura europeia trazida pelos colonizadores (Lacerda *et al.*, 2013). O país possui enorme biodiversidade de plantas com ação medicinal, onde calcula-se existir cerca de 55.000, ou seja, 20 % do total de espécies no mundo (IBGE, 2015).

O *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco), pertencente à família malvaceae, contendo mais de 200 gêneros com cerca de 2.300 espécies de plantas. É um arbusto herbáceo anual, medindo em torno de 1,52 a 5m de altura. Trata-se de uma espécie de fácil reconhecimento pelo cálice e epicálice carnosos de coloração vermelha até vinácea. Provavelmente de origem africana, também cultivado em áreas da Índia, Ásia, América e Austrália possivelmente introduzido no Brasil pelos escravos. Conhecida como hibisco, quiabo-de-angola, azedinha, carurú, *roselle* e vinagreira. Cultivada em várias partes do mundo com fim alimentício (Esteves *et al.*, 2014).

Estudos sugerem que a parte da planta considerada mais importante são os cálices formados pelas sépalas que cercam o fruto. Os diferentes extratos obtidos a partir dos cálices de hibisco são conhecidos por conter constituintes químicos, incluindo, alcaloides, ácido L-ascórbico, ácido cítrico, antocianinas e flavonoides, podendo ser aplicados como conservantes alimentares (Peter *et al.*, 2014).

Staphylococcus spp. é uma bactéria esférica (coco) Gram-positiva, existente no ar, na poeira, na água, na carne ou nos equipamentos de processamento de alimentos, nos seres humanos e nos animais, sendo estes dois últimos os principais reservatórios do agente (Germano e Germano, 2011). *Staphylococcus aureus* pode ocorrer em diversos

alimentos, sendo necessário entre 10^5 e 10^6 unidades formadoras de colônia e/ou de 1 µg de toxina por grama de alimento para se iniciarem os sintomas clínicos, incluindo náusea, vômito, espasmo abdominal e, ocasionalmente, diarreia (Jay, 2005).

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram-negativa, anaeróbica facultativa, faz parte do grupo *Enterobacteriaceae*. É encontrada, normalmente, nos intestinos dos animais e do homem. Representa 80% da flora intestinal aeróbia, sendo eliminada nas fezes, o que propicia a contaminação dos solos e das águas (Germano e Germano, 2011). As cepas patogênicas, por exemplo, nas infecções enterohemorrágicas e enteroinvasivas, doses de 10 células ou menos, podem causar enfermidades graves, enquanto a *E. coli* enterotoxigênica requer um número de células estimado em 10^8 a 10^{10} para causar enfermidade (Forsythe, 2013).

A indústria de carnes é uma das principais do setor de alimentos, dados da *Food and Agriculture Organization* (FAO) indicam que a produção bovina de carnes alcançou 292 milhões de toneladas em 2010 (IBGE, 2014).

Os métodos de conservação se baseiam não só na diminuição da intensidade de ação dos elementos deteriorantes, mas também na modificação das condições necessárias à vida microbiana, tornando o substrato um meio inadequado aos microrganismos (Silva Jr., 2013). O emprego da acidificação na conservação dos alimentos é um método efetivo, uma vez que os principais patógenos de origem alimentar se multiplicam melhor em pH neutro. O estresse ácido pode ser utilizado como meio conservante, interferindo na redução da multiplicação das células bacterianas (Forsythe, 2013).

A contagem de bactérias mesófilas aeróbias é utilizada como indicador geral de populações bacterianas em alimentos e superfícies, avaliando a qualidade do produto, condições de processamento e a vida de prateleira, definida como o tempo transcorrido desde a produção e a embalagem do alimento até o ponto que se torna inaceitável para o consumo (Forsythe, 2013).

O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antibacteriano dos extratos etanólico e hidroetanólico de *Hibiscus sabdariffa* L. a diferentes concentrações e sua aplicação como aditivo alimentar sobre a estabilidade de carne moída bovina, durante armazenagem sob refrigeração.

MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram desenvolvidos nos laboratórios do Centro de Ensino, Pesquisa e Tecnologia de Carnes (CEPETEC) da Faculdade de Veterinária e no Instituto de Ciências e Tecnologia de Alimentos (ICTA) ambos da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre, RS.

O material de estudo constituiu-se de amostras de cálices *Hibiscus sabdariffa* L. (hibisco) fresco, safra 2013/2014, adquiridos de um único produtor (coordenadas geográficas 29° 21' 57" S e 50° 48' 57" O) na Feira de Agricultores Ecologistas (FAE) do município de Porto Alegre, RS, Brasil, cultivados sob sistema orgânico, no contexto da agricultura familiar, no bairro Lami do mesmo município. A amostra foi identificada botanicamente e encaminhada como exsicatas para registro no Herbário do Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia da UFRGS, recebendo o registro ICN 165039.

Para as análises microbiológicas, foram utilizadas as sépalas dos cálices, desprezando os frutos com as sementes. As extrações foram feitas com as sépalas frescas e com as sépalas secas em estufa com circulação de ar à 40 °C por 48 horas.

Foram feitas duas extrações: alcoolatura e tintura (hidroalcoolatura) de acordo com o preconizado pela Farmacopéia Brasileira (1987).

Foram desafiadas duas linhagens bacterianas padrão ATCC (*American Type Culture Collection*), uma Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e uma Gram-negativa: *Escherichia coli* (ATCC 11229) provenientes da coleção - bacterioteca do Laboratório de Higiene do Instituto de Ciências e Tecnologia dos Alimentos/UFRGS mantidas em meio *Nutrient Agar* (OXOID®), reativadas em infusão de cérebro e coração BHI (OXOID®) à 36 °C ±1 °C por 18 a 24 horas de incubação aeróbia para atingir concentração $\geq 1,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colônias (UFC.mL).

A avaliação da concentração inicial foi realizada através da técnica de microgota (Romeiro, 2008). Foram realizadas diluições seriadas até a diluição 10^{-8} , sendo a contagem de microrganismos viáveis e o valor final obtido da média das contagens das gotas triplicadas avaliadas biometricamente, segundo Cavalli-Sforza (1974).

Para a determinação da atividade antibacteriana foi utilizado o Teste de Diluição (Deutsche..., 1980) com base na técnica do sistema de tubos múltiplos, modificada por Avancini *et al.* (2008); Wiest *et al.* (2009), tubos de ensaio contendo 4,5 mL de meio de cultura BHI caldo, 4,5 mL dos diferentes extratos nas concentrações 6,25, 12,5, 25 e 50 expressas em % (v/v), posteriormente desafiadas com 1 mL dos inóculos padrões.

Os resultados da atividade antibacteriana foram representados por variáveis ordinais arbitrárias, valores de 9 a 1, sendo que o valor de 9 (nove) representa a atividade máxima dos extratos e 1 (um) a não-atividade (Tab. 1).

Tabela 1. Representação dos valores ordinais arbitrários de intensidade de atividade atribuídos às variáveis da Atividade Antibacteriana e suas correspondentes diluições e doses infectantes dos inóculos.

9	8	7	6	5	4	3	2	1	Variáveis ordinárias arbitrárias de intensidade de atividade antibacteriana
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}	10^{-8}	*n.a	**UFC.mL – diluições de inóculo inibidas ou inativadas pelos extratos
10^8	10^7	10^6	10^5	10^4	10^3	10^2	10^1	n.a	UFC.mL – doses infectantes inibidas ou inativadas pelos extratos

*n.a: ausência de atividade antibacteriana;

**UFC.mL: Unidades Formadoras de Colônias por mL.

A amostra de carne moída bovina de segunda qualidade utilizada, foi adquirida na condição de consumidor, em um estabelecimento varejista do município de Porto Alegre, RS. Realizou-se análises quanto à presença de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, em triplicatas para comprovar a qualidade inicial do produto.

Inóculos de *S. aureus* e *E. coli* foram preparados nas densidades populacionais de 10^4 a 10^8 UFC.mL conforme observações de Barbosa *et al.* (2009) sendo estes utilizados para inoculação nas amostras de carne moída bovina em teste.

Para preparação dos tratamentos, as unidades experimentais cárneas foram elaboradas em diferentes concentrações dos extratos vegetais e posteriormente contaminados com os inóculos bacterianos. As unidades experimentais pesaram 200 g no total, sendo assim constituído o tratamento TE5 %: 180 g de carne moída, 10 mL de extrato etanólico e 10 mL de cada densidade populacional de inóculo bacteriano, individualmente. O TH5 %: 180 g de carne moída, 10 mL de extrato hidroetanólico e 10 mL de cada densidade populacional de inóculo bacteriano, e assim sucessivamente para os tratamentos: TE10 %, TE15 %, TE20 %, TH10 %, TH15 % e TH20 %.

Foram elaborados 3 kg de produto, totalizando 15 frascos de 200 g por tratamento, homogêneos e acondicionados separadamente. As unidades experimentais foram mantidas em frascos de vidro, permanecendo durante 24 horas sob refrigeração a temperatura de 7 °C.

Para as análises bacteriológicas, foi utilizada a metodologia preconizada na Instrução Normativa nº 62, de 26 de agosto de 2003, do MAPA que oficializa os Métodos Analíticos para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal

e Água (Brasil, 2003). Para a quantificação de *S. aureus*, foi utilizado o método de contagem *Spreadplate* foram transferidas de cada diluição alíquotas de um 0,1 mL do inóculo para placas de Petri, em duplicata, esterilizadas contendo o meio *Baird Parker* enriquecido com solução de gema de ovo com telurito de sódio (KASVI®) (Brasil, 2003).

Para a detecção de *E. coli*, realizou-se metodologia descrita acima com modificações. A quantificação de *E. coli* foi realizada utilizando como meio de cultura o *Chromocult Coliform Agar* (MERCK®) com substrato cromogênico, sendo o inóculo incubado a temperatura de 36 °C por 24 horas. Após este período, efetuou-se a contagem das colônias típicas de *E. coli* com coloração azul escura.

A amostra cárnea já descrita acima, foi acrescida dos extratos constituindo os seguintes tratamentos: T0 - controle sem adição de extrato; T1 - 20% de extrato etanólico; T2 - 30% de extrato etanólico; T3 - 20% do extrato hidroetanólico e T4 - 30% do extrato hidroetanólico de hibisco. Nestes Tratamentos a carne foi acondicionada em sacos plásticos estéreis e homogeneizadas em aparelho *Stomacher*, totalizando 3 frascos de 200 g por tratamento.

Simulando o estudo da vida útil esses tratamentos foram observados nos tempos 0, 1, 2, 3, 6 e 9 dias, à temperatura de 7 °C, através das dos indicadores pH e contagem de microrganismos mesófilos aeróbios.

O pH foi determinado segundo metodologia descrita por AOAC (2012), com uso de potenciômetro (PHmeter pH-208®), utilizando eletrodo de vidro, inserido no centro da amostra cárnea, sendo previamente calibrado com pH 4,0 e pH 7,0.

Na contagem total de bactérias mesófilas aeróbias segundo Brasil (2003) utilizou-se a técnica de semeadura em profundidade *Pour plate*, empregando-se o meio PCA (OXOID®). A análise estatística das avaliações antibacterianas e físico-química foi realizada utilizando-se os procedimentos da estatística descritiva. Como foi observado que os dados não obedeciam a um padrão de normalidade, a análise entre as variáveis foi efetuada utilizando-se o teste de associação não paramétrico de Kruskal-Wallis, ao nível de 5% de significância empregando o programa estatístico “SAS (*Statistical Analysis System*) for Windows 9.0”, para as três repetições.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos *in vitro*, levando em consideração os inóculos bacterianos, os tempos de confronto e os extratos de hibisco nas diferentes concentrações são

observados na Tab. 2, ao comparar os inóculos bacterianos testados quanto a classificação “gram” não foi possível observar seletividade na ação antibacteriana quanto a composição da parede celular, não sendo fator limitante para atuação dos extratos.

Tabela 2. Atividade de extratos *Hibiscus sabdariffa*, sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, em diferentes concentrações e tempos de contato.

Concentração (%)	Atividade antibacteriana dos extratos											
	<i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i> (ATCC)						<i>ESCHERICHIA COLI</i> (ATCC)					
	Extrato Etanólico			Extrato Hidroetanólico			Extrato Etanólico			Extrato Hidroetanólico		
	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas	24 horas	48 horas	72 horas
6,25	1,0 ^{aB}	1,0 ^{aB}	1,0 ^{aB}	2,3 ^{aB}	2,3 ^{aB}	1,7 ^{aB}	2,0 ^{aB}	2,0 ^{aB}	2,0 ^{aB}	2,3 ^{aB}	2,0 ^{aB}	2,3 ^{aB}
12,5	6,7 ^{aA}	8,7 ^{bA}	9,0 ^{bA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	8,0 ^{aA}	8,7 ^{aA}	8,7 ^{aA}	8,7 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}
25	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}
50	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}	9,0 ^{aA}

9 a 1=valores arbitrários que representam a intensidade atividade dos extratos sobre densidades logarítmicas populacionais (média de três repetições). 9= atividade sobre a maior densidade populacional e 1= não atividade. Letras minúsculas diferentes sobscritas na mesma linha indicam diferenças significativas entre os tempos para a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas diferentes sobscritas na mesma coluna indicam diferença significativa entre as concentrações pela análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

Evidencia-se que os extratos nas concentrações 12,5, 25, e 50 % possuem efeito antibacteriano sobre os inóculos bacterianos ($p < 0,05$), e quando observada à concentração de 6,25 % nota-se nenhuma ou praticamente nenhuma atividade para ambos inóculos. Foi marcadamente homogêneo o resultado da atividade com relação a concentrações e os tempos de contato frente aos dois inóculos.

Nota-se que no teste estatístico utilizado, o tempo de confronto influenciou na atividade do extrato etanólico sobre *S. aureus* unicamente na concentração 12,5 %, sendo significativamente menor ($p < 0,05$) nas primeiras 24 horas, aumentando sua ação antiestafilocócica quanto maior o tempo de contato nas 48 e 72 horas posteriores, atuando sobre uma maior densidade populacional, agindo sobre 10^5 passando a 10^8 UFC.mL.

Percebendo-se que esta homogeneidade ocorreu independente do extrato.

Observa-se haver marcada semelhança na atividade das soluções da planta quando obtidas através dos extratos etanólico ou hidroetanólico. No ponto de vista prático, significa que a logística de armazenamento da planta permite a conservação através do processo de secagem, não influenciando na sua atividade frente os inóculos *in vitro*.

Os resultados da ação antibacteriana dos extratos frente a *S. aureus* e *E. coli* nos diferentes tratamentos, em relação as densidades populacionais nas amostras cárneas, estão apresentados na Tab. 3.

Tabela 3. Atividade antibacteriana de diferentes concentrações de extratos de *Hibiscus sabdariffa* em modelo cárneo contaminado experimentalmente com diferentes densidades populacionais de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* padrão

Tratamentos	Doses infectantes <i>Staphylococcus aureus</i> UFC.g				
	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁸
TE _{5%}	3,0x10 ^{3aA}	4,4x10 ^{4abA}	4,6x10 ^{5bcA}	≥1,0x10 ^{6cdA}	≥1,0x10 ^{6dA}
TE _{10%}	5,6x10 ^{3aA}	1,6x10 ^{4abA}	1,1x10 ^{5bcA}	8,1x10 ^{5cdA}	≥1,0x10 ^{6dA}
TE _{15%}	4,5x10 ^{2aA}	4,2x10 ^{3abA}	2,9x10 ^{4bcA}	1,6x10 ^{5cdA}	≥1,0x10 ^{6dA}
TE _{20%}	≤2,0x10 ^{2aA}	2,2x10 ^{3abA}	3,6x10 ^{4bcA}	3,3x10 ^{5cdA}	≥1,0x10 ^{6dA}
TH _{5%}	2,5x10 ^{2aA}	6,3x10 ^{3abA}	3,3x10 ^{3bcA}	9,1x10 ^{4cdA}	5,5x10 ^{5dA}
TH _{10%}	≤2,0x10 ^{2aA}	7,6x10 ^{2abA}	2,6x10 ^{3bcA}	5,1x10 ^{4cdA}	1,7x10 ^{5dA}
TH _{15%}	≤2,0x10 ^{2aA}	7,9x10 ^{2abA}	7,7x10 ^{3bcA}	9,0x10 ^{4cdA}	1,2x10 ^{5dA}
TH _{20%}	≤2,0x10 ^{2aA}	3,9x10 ^{2abA}	2,6x10 ^{3bcA}	2,6x10 ^{4cdA}	4,9x10 ^{5dA}
Doses infectantes <i>Escherichia coli</i> UFC.g					
TE _{5%}	4,0x10 ^{2aA}	6,9x10 ^{3abA}	7,1x10 ^{4bcA}	4,6x10 ^{5cdA}	≥1,0x10 ^{6dA}
TE _{10%}	1,9x10 ^{3aA}	2,1x10 ^{3abA}	1,0x10 ^{4bcA}	1,2x10 ^{5cdA}	≥1,0x10 ^{6dA}
TE _{15%}	1,5x10 ^{3aA}	1,9x10 ^{4abA}	5,7x10 ^{4bcA}	2,3x10 ^{5cdA}	≥1,0x10 ^{6dA}
TE _{20%}	2,1x10 ^{2aA}	4,3x10 ^{3abA}	3,9x10 ^{4bcA}	5,9x10 ^{5cdA}	≥1,0x10 ^{6dA}
TH _{5%}	3,5x10 ^{3aA}	5,5x10 ^{3abA}	5,9x10 ^{4bcA}	7,6x10 ^{5cdA}	≥1,0x10 ^{6dA}
TH _{10%}	2,1x10 ^{3aA}	5,3x10 ^{3abA}	5,8x10 ^{4bcA}	2,2x10 ^{5cdA}	≥1,0x10 ^{6dA}
TH _{15%}	1,6x10 ^{3aA}	6,3x10 ^{3abA}	7,1x10 ^{4bcA}	1,0x10 ^{5cdA}	6,4x10 ^{5dA}
TH _{20%}	7,3x10 ^{3aA}	6,2x10 ^{3abA}	2,9x10 ^{4bcA}	1,4x10 ^{4cdA}	1,1x10 ^{5dA}

TE (Tratamento Etanólico: 5, 10, 15 e 20 %); TH (Tratamento Hidroalcoólico: 5, 10, 15 e 20 %). Valores UFC.g que representam a atividade antibacteriana (média de três repetições). Letras minúsculas diferentes sobescritas na mesma linha indicam diferenças significativas entre as doses infectantes em relação ao mesmo extrato, para mesma bactéria, na análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas diferentes sobescritas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os extratos em relação a mesma dose infectante, para mesma bactéria, pela análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

Observando a atividade especificamente do extrato etanólico em confronto com *S. aureus* para os tratamentos entre 15 e 20 % observa-se comportamento semelhante reduzindo até dois níveis logarítmicos (UFC.g) para ambas densidades populacionais testadas, havendo diferença significativa ($p < 0,05$) conforme a dose infectante em teste.

S. aureus em alimentos cárneos pode ser um indicativo de condições higiênico-sanitárias inapropriadas sendo uma bactéria procedente principalmente de manipuladores de alimentos, podendo a carga bacteriana de 10⁵ UFC.g, significar risco epidemiológico, porque essa quantidade é compatível com a produção de toxina termoestável em concentração suficiente para a ocorrência de surtos de intoxicação alimentar estafilocócica (Forsythe, 2013). Estes valores foram utilizados como parâmetros de limitação microbiológica para as unidades experimentais cárneas avaliadas, sendo os valores de 10⁴ UFC.g considerados a especificação microbiológica máxima tolerável para os tratamentos, tendo em vista a inexistência na determinação deste padrão na legislação específica para esta matéria-prima.

A ação antibacteriana dos tratamentos hidroetanólicos (TH) apresenta valores semelhantes ($p > 0,05$), reduzindo até três níveis logarítmicos (UFC.g) as doses infectantes iniciais de *S. aureus*. Nestes confrontos observa-se uma eficácia relevante, superior em relação aos tratamentos etanólicos (TE), para as mesmas doses infectantes testadas.

Ao compararmos os tratamentos TE15 e TH5 % frente doses infectantes iniciais de 10^6 e 10^7 , respectivamente, os tratamentos apresentam a redução para níveis seguros de 10^4 UFC.g, levando em consideração a possível inexistência de toxinas em 24 horas de contato. Forsythe (2013) destaca que o número mínimo de microrganismos passíveis de causar toxinfecção é dependente da espécie envolvida, das condições intrínsecas do alimento, e a fatores relacionados ao ambiente.

Cabe ressaltar que doses infectantes patogênicas tão elevadas ($\geq 10^6$ UFC.g) são difíceis de serem encontradas normalmente em alimentos, sem que as características organolépticas estejam comprometidas pela ação dos microrganismos (Silva Jr., 2013).

O comportamento dos extratos (Tab. 3) frente a *E. coli* foi dose-dependente ($p > 0,05$). A ação antibacteriana, reduziu praticamente em todos os tratamentos dois níveis logarítmicos, a partir da mesma dose infectante inicial. Quanto ao número de *E. coli*, observa-se a eficácia dos extratos agindo sobre 10^6 UFC.g, em todos tratamentos ($p > 0,05$), reduzindo ao limite microbiológico de 10^4 UFC.g. Demonstrando uma homogeneidade constante em relação a ação antibacteriana.

A alta contagem de coliformes fecais não é necessariamente indicativo de enfermidade, sendo necessário doses acima de 10^5 UFC.g para provocar doença, dependendo da classe envolvida, das condições intrínsecas do alimento e fatores ambientais. Entretanto, são considerados indicadores sanitários notáveis por apontarem contaminação fecal, manipulação inadequada, higiene insatisfatória e possível presença de microrganismos patogênicos no alimento (Germano e Germano, 2011).

Observa-se que o tratamento TH20 % apresenta uma maior redução das UFC.g, quando relacionado aos demais tratamentos e as maiores doses infectantes. Isso pode ser explicado pelo fato, quanto maior a proporção de extrato, maior é a quantidade de compostos antibacterianos presentes, para o teste. Concordando com Hyldgaard *et al.* (2012) que estudando óleos essenciais sugerem ser necessárias dosagens em concentrações elevadas, a fim de alcançar a atividade antimicrobiana suficiente para conservação dos alimentos.

Com relação aos inóculos bacterianos em todos os tratamentos percebeu-se que os extratos promoveram uma maior atividade sobre *S. aureus*, que foi mais sensível na maioria dos casos, em comparação com *E. coli*.

O comportamento do pH nas unidades experimentais cárneas contendo extratos etanólico e hidroetanólico de hibisco, pode ser visualizado na Tabela 4.

Tabela 4. Comportamento do pH e contagem de microrganismos mesófilos aeróbios (UFC.g) em tratamentos contendo extratos de *Hibiscus sabdariffa*.

		Período em dias					
Testes	Tratamentos	0	1	2	3	6	9
pH	T0 (controle)	5,02 ^{aA}	5,22 ^{bA}	5,06 ^{aA}	5,04 ^{aA}	6,08 ^{cA}	7,10 ^{dA}
	T1	4,18 ^{aB}	4,30 ^{bB}	4,03 ^{cB}	4,09 ^{cB}	4,16 ^{aB}	4,23 ^{aB}
	T2	3,51 ^{aC}	3,92 ^{bC}	3,65 ^{cC}	3,69 ^{cdC}	3,77 ^{dC}	3,90 ^{bC}
	T3	3,36 ^{aD}	3,34 ^{aD}	3,47 ^{bD}	3,81 ^{cD}	3,75 ^{cdC}	3,68 ^{dD}
	T4	2,89 ^{aE}	2,95 ^{abE}	3,02 ^{bdE}	3,24 ^{cE}	3,24 ^{cd}	3,09 ^{dE}
Mesófilos UFC.g	T0 (controle)	5,4x10 ^{6aA}	6,3x10 ^{6bA}	7,3x10 ^{6cA}	1,0x10 ^{7dA}	2,0x10 ^{7eA}	7,3x10 ^{7fA}
	T1	3,2x10 ^{6aA}	2,3x10 ^{6bA}	2,3x10 ^{6bA}	1,2x10 ^{6cAB}	1,2x10 ^{6cAC}	1,2x10 ^{6cAC}
	T2	1,1x10 ^{6aA}	4,3x10 ^{5bA}	4,5x10 ^{5bA}	1,4x10 ^{5cB}	6,5x10 ^{4dB}	6,3x10 ^{4dB}
	T3	9,1x10 ^{5aA}	1,7x10 ^{6bA}	3,3x10 ^{6cA}	3,4x10 ^{6cAB}	3,5x10 ^{6cAC}	3,5x10 ^{6cAC}
	T4	2,9x10 ^{5aA}	1,4x10 ^{5bA}	1,2x10 ^{5bA}	1,0x10 ^{5bB}	2,1x10 ^{5cBC}	2,3x10 ^{5cBC}

T1 (80:20 % Extrato etanólico); T2 (70:30 % Extrato etanólico); T3 (80:20 % Extrato Hidroetanólico) e T4 (70:30 % Extrato Hidroetanólico). Valores correspondentes a média de três repetições. Letras minúsculas diferentes sobscritas na mesma linha indicam diferenças significativas entre o tratamento em relação aos diferentes dias para a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis a 5% de probabilidade. Letras maiúsculas diferentes sobscritas na mesma coluna indicam diferença significativa entre os tratamentos em relação a cada dia para a análise não paramétrica de Kruskal-Wallis, a 5% de probabilidade.

Na análise da atuação do T0 (controle), nota-se, no período final do armazenamento (dia 9), o aumento de pH, o que se assemelha ao estudo de Arreguy Baptista *et al.* (2013) que avaliando carnes moídas, encontraram pH superiores a 6,5, ou seja, impróprias para o consumo. Segundo Jay (2005) o início da degradação da carne é acompanhado por um aumento no pH. Este aumento nos valores de pH durante armazenamento provavelmente deve-se a atividade proteolítica, processo este que aumenta a pressão osmótica do meio em consequência da degradação das proteínas e a reorganização intramolecular destas moléculas que determinam modificações nas suas cargas elétricas conforme Lawrie (2005).

Na utilização dos extratos como aditivo cárneo, na primeira leitura (tempo zero) houve um decréscimo significativo ($p < 0,05$) imediato atingindo valores de pH inferiores a 5,0 para todos os tratamentos em comparação ao T0 (controle). Este fato pode ser atribuído a acidez dos extratos empregados em diferentes proporções, onde segundo

Juven *et al.* (1994) a potência antimicrobiana dos componentes extraídos do vegetal também depende do pH.

Foi possível observar que, à medida que se aumenta a proporção do aditivo, diminui o pH da carne. Os tratamentos com adição dos extratos hidroetanólicos (T3 e T4) apresentaram os menores valores de pH, em comparação aos demais tratamentos. Segundo Forsythe (2013) a acidificação é um método de conservação bastante empregado em alimentos, sendo efetivo, uma vez que os principais patógenos de origem alimentar se multiplicam melhor em pH neutros. Desta forma, no 2º dia todos os tratamentos apresentaram valores de pH próximos a 4,0, que se mantiveram constantes durante os 9 dias de avaliação, podendo contribuir na conservação do alimento, afetando a multiplicação de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes. Considerando que o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*, bactérias mesófilas, pode apresentar-se na faixa mínima de pH compreendida entre 4,2 a 4,3 conforme relatado por Silva jr. (2013).

A evolução dos microrganismos mesófilos aeróbios durante o período de armazenamento das unidades experimentais cárneas é mostrada na Tab. 4.

Verifica-se que no início da análise, dia zero, o T0 (controle) e os tratamentos T1 e T2 apresentaram uma contagem inicial de bactérias mesófilas semelhante, $\geq 1 \times 10^6$ UFC.g, as quais foram superiores aos tratamentos T3 e T4. No entanto, em relação ao período de armazenagem até o 2º dia de análise não há diferença estatística ($p < 0,05$) entre todos os tratamentos.

Após o dia zero de armazenagem até o 9º dia de análise, os tratamentos T1 e T3 não diferiram estatisticamente ($p > 0,05$), com uma contagem próxima a 10^6 impedindo a evolução bacteriana quando comparados, no mesmo período, ao T0 (controle). Os valores iniciais detectados de bactérias mesófilas são considerados elevados, demonstrando uma duvidosa qualidade higiênico-sanitária da matéria-prima.

Embora a legislação brasileira (Brasil, 2001) não estabeleça limites de tolerância para o grupo de microrganismos mesófilos aeróbios, populações elevadas desse grupo representa qualidade higiênico-sanitária deficiente, muitas vezes por má qualidade da matéria-prima aliada a tempo e temperatura de estocagem inadequados. Quando populações de bactérias mesófilas ultrapassam 10^6 UFC.g, a vida de prateleira deste produto torna-se comprometida (Forsythe, 2013). Assim, corroborando com Silva jr. (2013) analisando o pH e contagem de bactérias mesófilas, a partir do 3º dia verifica-se que T0 (controle) se torna impróprio para consumo.

A partir do 3º dia os tratamentos T2 e T4 apresentam um efeito antibacteriano significativo ($p < 0,05$) em relação ao T0 (controle), reduzindo a níveis aceitáveis a contagem inicial bacteriana, se mantendo praticamente estáveis até o 6º dia de verificação, quando o tratamento T2, apresentou uma queda de aproximadamente um nível logarítmico, não diferindo estatisticamente do tratamento T4. Demonstrando similaridade entre os extratos etanólico e hidroetanólico, sugerindo, ser o fator limitante, a utilização das maiores proporções dos aditivos (extratos) para a conservação da carne moída.

Este decréscimo na contagem de bactérias mesófilas deve-se aos compostos bioativos presentes nos aditivos naturais e também ao abaixamento do pH durante o armazenamento. A composição dos extratos vegetais utilizados depende de vários fatores como o momento da colheita da planta, variedade, a parte do vegetal utilizada, e o método de extração (Hyldgaard *et al.*, 2012).

CONCLUSÕES

A atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos etanólicos e hidroetanólicos de hibisco apresentou-se distinta em relação a concentração dos extratos. Na concentração a 50% foram os que apresentaram melhor eficácia antibacteriana.

A ação antibacteriana dos extratos foi dose-dependente em relação as diferentes densidades populacionais de *S. aureus* e *E. coli*. O extrato hidroetanólico foi que apresentou maior potencial quando observado a redução da UFC.g na presença de carne moída.

A utilização dos extratos nas diferentes proporções influenciou na redução do pH da carne moída, havendo interação entre o período de armazenamento e o pH.

Os tratamentos mais eficazes foram o T2 e T4 contendo 30% de extrato hidroetanólico. Sendo T4 capaz de reduzir as contagens em 2,5 Log/g ao 9º dia de verificação.

REFERÊNCIAS

AOAC - ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. Official methods of analysis of the AOAC International. 19.ed. Washington: AOAC, 2012.

ARREGUY BAPTISTA, R. I. A., DE MOURA, F. M. L., FERNANDES, M. F. T. S., *et al.* Aspectos qualitativos da carne moída comercializada na região metropolitana do recife-pe. *Acta Veterinaria Brasilica*, v.7, n.1, p.38-47, 2013.

AVANCINI C.M.; WIEST J.M.; DALL'AGNOL R.; *et al.* Antimicrobial activity of plants used in the prevention and control de bovine mastitis in southern Brazil. *Latin American Journal of Pharmacy*, v.27, p.894-899, 2008.

BARBOSA, L.N.; RALL, V.L.; FERNANDES, A.A.; *et al.* Essential Oils Against Foodborne Pathogens and Spoilage Bacteria in Minced Meat. *Foodborne Pathogens and Dieases*, v.6, p.725-728, 2009.

BRASIL, Ministério da Agricultura. Instrução Normativa n° 62 de 26 de Agosto de 2003. Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Água. Diário Oficial da União, Brasília-DF, seção 1, p. 14, 18 de setembro de 2003. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=2851>> Acessado em: 09 ago. 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RDC n°12 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm> Acessado em: 09 ago. 2015.

CAVALLI-SFORZA L. Biometrie: Grundzüge biologisch-medizinische Statistic (Biometria: fundamentos de estatística viológicamedica). Stuttgart: Gustav Fisher; 1974. 204p.

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: Eigenverlag, 1980.

ESTEVEES, G. L., DUARTE, M. C., TAKEUCHI, C. Sinopse de *Hibiscus* L. (Malvoideae, Malvaceae) do Estado de São Paulo, Brasil: espécies nativas e cultivadas ornamentais. *Hoehnea*. v.4, n.4, p.529-539, 2014.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 3.ed. São Paulo: Organização Andrei Editora; 1987. 1218p.

FORSYTHE, S. J., Microbiologia da segurança dos alimentos. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2013. 607p.

GERMANO, P.M.L.; GERMANO, M.I.S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos. 4.ed. São Paulo: Manole, 2011. 1088p.

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, v.3, p.1-24, 2012.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Estatística da Produção Pecuária, 2014. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos/201403/publ/completa.pdf>>. Acessado em: 1 de abril de 2015.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Espécies de plantas, 2015. Disponível em: <<http://teen.ibge.gov.br/mao-na-roda/>>. Acessado em: 11 de nov. 2015.

JAY, J.M. Microbiologia de alimentos. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, 517-542p.

JUVEN, B. J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that interact with the antibacterial action of thyme essential oil and its active constituents. *Journal of applied bacteriology*, v.76, p.626-631, 1994.

LACERDA, J. R. C.; SOUSA, J. D. S.; SOUSA, L. C. F. S.; *et al.* Conhecimento popular sobre plantas medicinais e sua aplicabilidade em três segmentos da sociedade no município de Pombal-PB. *Agropecuária Científica no Semi-árido*, v.9, p.14-23, 2013.

LAWRIE, R. A. Ciência da carne. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 384p.

PETER E., MASHOTO, K. O., RUMISHA, S. F., *et al.* Iron and Ascorbic Acid content in *Hibiscus sabdariffa* Calyces in Tanzania: Modelling and Optimization of Extraction Conditions. *International Journal of Food Science and Nutrition Engineering*, v.4, n.2, p.27-35, 2014.

ROMEIRO R.S. Técnica de microgota para contagem de células bacterianas viáveis em uma suspensão. Laboratório de Bacteriologia de Plantas. Viçosa (MG): Universidade Federal de Viçosa. 2008. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dfp/bac/uni9.pdf>>. Acessado em: 09 jan. 2015.

SILVA jr. E. A. da. Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação. 6.ed. São Paulo: Livraria Varela, 2013.

WIEST, J.M.; CARVALHO, H.H.C.; AVANCINI, C.A.M.; GONCALVES, A.R. Inibição e inativação in vitro de *Salmonella* spp. com extratos de plantas com indicativo etnográfico medicinal ou condimentar. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.* v.61, n.1, p.119-127, 2009.

7 - CONSIDERAÇÕES FINAIS

Tendo em vista a segurança alimentar e nutricional em produtos que contenham matéria prima cárnea de origem bovina, principalmente, em alimentos que possam servir como alternativa para a agricultura/agroindústria familiar de pequeno porte. Este estudo demonstrou que os extratos etanólico e hidroetanólico de *Hibiscus sabdariffa* L., podem ser usados como aditivos fonte de polifenóis, antocianinas e antioxidantes naturais.

Levando-se em consideração a composição físico-química dos extratos de *Hibiscus sabdariffa* L. recomenda-se a utilização como fonte de proteína, fibras e carboidratos totais, e de minerais, K, Ca e Mn por apresentarem valores relevantes para a função biológica e como fonte de nutrição, podendo ser aplicados em produtos cárneos.

Os resultados obtidos permitem afirmar que os baixos valores de pH e as quantidades de ácido cítrico sugerem a utilização dos extratos *Hibiscus sabdariffa* L., em proporções, por contribuírem com a atividade antibacteriana, mostrando-se promissores nos estudos que visam à obtenção de novos antimicrobianos alimentares com vistas a conservação da matéria prima.

Como recomendação sugere-se a utilização dos extratos de *Hibiscus sabdariffa* L. como aditivo conservante cárneo, em diferentes proporções, por seu efeito antibacteriano nesse alimento, sendo capaz de prolongar a vida de prateleira da carne. Seu uso deve ser moderado em níveis aceitáveis pelos consumidores e que este procedimento não deve ser utilizado como único meio de conservação de alimentos. Vale salientar que estudos futuros são necessários, em particular sobre aceitação dos extratos etanólicos e hidroetanólicos como aditivo no alimento testado.

REFERÊNCIAS

- ABO-BAKER, A.A, MOSTADA, G.G. Effect of bio- and chemical fertilizer on growth, sepals yield and chemical composition of *Hibiscus sabdariffa* at new reclaimed soil of South Valley area. **Asian Journal of Science**, 3, p. 16-25. 2011.
- ABU- TARBOUSH, H. M., AHMED, S. A. B AND ALKAHTANI H. A. Some nutritional properties of Karkade (*Hibiscus sabdariffa* L) seed products. **Cereal Chemistry**.74 (3). p. 352-355. 1997.
- AHMED, E.M.; BARMORE, C.R. Avocado, In: NAGY, S.; SHAW,P.E.; WARDOWSKI, W.F.(Ed.). Fruits of tropical and subtropical origin: composition, properties and uses. **Lake Alfred: AVI**. p. 121-156. 1990.
- AISHAH B, NURSABRINA M, NORIHAM A, NORIZZAH AR, MOHAMAD HAHRIMI H. Anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa*, *Melastoma malabathricum* and *Ipomoea batatas* and its colour properties. **International Food Research Journal**. 20(2). p.827-834. 2013.
- AKERELE, O.; HERBAL G.. 28 (13). 1993.
- AKERELE, O. Las plantas medicinales: un tesoro que no debemos desperdiciar. **Forum Mundial de la Salud**, n. 14, 1993. 390-395 p.
- AI HUSSAIN, F ANWAR, PS NIGAM, SD SARKER, JE MOORE, JR RAO, A MAZUMDAR. Antibacterial activity of some Lamiaceae essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. **LWT Food Sciences and Technology**, 44. p.1199-1206. 2011.
- ALVES CQ, DAVID JM, DAVID JP, BAHIA MV, AGUIAR RM. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Quim Nova**.33(10). p. 2202-10. 2010.
- ALVIM NAT, FERREIRA MA, FARIA PG, AYRES AV. **Tecnologias na enfermagem: o resgate das práticas naturais no cuidado em casa, na escola e no trabalho**. In: Figueiredo NMA, organizadora. *Tecnologias e técnicas em saúde: como e porque utilizá-las no cuidado de enfermagem*. São Paulo (SP): Difusão Editora. p. 338-55. 2004.
- AMES, B. N., SHIGENAGA, M. K., & HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 90(17). p. 7915-7922. 1993.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São José do Rio Preto, 66, (1). p. 1-9, 2007.

ANOMOHANRAN, EGUONO ESTHER. Evaluating the Viability of Lactic Acid Bacteria and Nutritional Quality of *Hibiscus Sabdariffa* Stored Under Natural Condition. **International Journal of Biology**, 7 (1), p. 116, 2014.

ARAI, S. Studies on functional foods in Japan: state of the art. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v. 60, n. 1, p. 9-15, 1996.

ATOUI, A. K., MANSOURI, A., BOSKOU, G., & KEFALAS, P.. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food chemistry**, 89(1), 27-36. 2005.

BADKE, M. R., BUDÓ, M. D. L. D., SILVA, F. M. D., RESSEL, L. B. **Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular**. Escola Anna Nery, 15 (1), p.132-9, 2011.

BAEZA, G.; AMIGO-BENAVENT, M.; SARRI, B.; GOYA, L.; MATEOS, R.; BRAVO, L. Green coffee hydroxycinnamic acids but not caffeine protect human HepG2 cells against oxidative stress. **Food Res. Int.** 62, p. 1038–1046. 2014.

BAILEY, A. E.; **Bailey's Industrial Oil And Fat Products**, 5th ed., John Wiley: New York, vol. 3, 1996.

BALDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil: seu aproveitamento industrial para produção de aromas e sabores**. Vitória: UFES, 2008. 623p.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**. 29, (1), p. 113-123, 2006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 83, de 21 de novembro de 2003. Institui o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Carne Bovina em Conserva (*Corned Beef*) e Carne Moída Bovina. **Diário Oficial da União**. Brasília, Seção 1, nov. 2003. 29.24 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/dab/docs/publicacoes/geral/pnpic.pdf>. Acesso em: 04 dez. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução RDC Nº 23, De 15 de Março de 2000. Dispõe sobre o **Manual de Procedimentos Básicos para Registros e Dispensa da Obrigatoriedade de Registro de Produtos Pertinentes à Área de Alimentos**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/scriptsweb/anvisalegis/VisualizaDocumento.asp?ID=243&Versao=1>. Acesso em: 21 Dez. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução CNNPA n. 12, de 1978. Normas Técnicas Especiais. **Diário Oficial da União**, Brasília, 23 de julho de 1978. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/resol/12_78_condimentos.htm>. Acesso em: 07 de dez. de 2014.

BRASIL. Portaria MS nº 33, de 13 de janeiro de 1998. Ingestão Diária Recomendada (IDR) para proteínas, vitaminas e minerais. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Brasília, 16 de jan. de 1998.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. **Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA)**. Aprovado pelo Decreto no. 30.691, 29/03/52, alterado pelos Decretos no 1255 de 25/06/62, 1236 de 02/09/94, 1812 de 08/02/96 e 2244 de 04/06/97. Brasília, 1952. 241 p.

BRITO, V. F. S; DANTAS, I. C; DANTAS, G. D. S. Plantas medicinais utilizadas pela comissão de mulheres na zona rural no município de Lagoa Seca–PB. **Revista de Biologia e Farmácia**, Campina Grande, 3 (1), p. 112-123. 2009.

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

BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. Biochemistry & molecular biology of plants. Rockville: **American Society of Plant Physiologists**, 40, p. 456-458, 2000.

BURDA, S., OLESZEK, W. Antioxidant and antiradical activities of flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 49(6), p. 2774-2779. 2001.

CAPITA, R.; ALONSO-CALLETA, C.; GRACIA- FERNANDEZ, M.C. et.al. Aspectos de interés en la calidad microbiológica de la carne de pollo. **Eurocarne**, v.9. n.73, p.73-86,1999.

CARDOSO, M.G.; CASTRO, D.P.; AGUIAR, P.M. **Plantas aromáticas e condimentares**. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas), 78p. Faculdade de Ciências da Cidade de São Paulo, 2006.

CARMO, I. Equilíbrio vital: Vitaminas e minerais. Publicações **D. Quixote**. Lisboa. 2011.

CASTERA-ROSSIGNOL, A., BOSQUE, F. **Nouvelle approche des anti-oxydants**. OCL. Oléagineux, corps gras, lipides, 1(2), p. 131-143. 1994.

CAVALCANTI MLF. Fibras alimentares. **Rev. Nutr. PUCAMP**; 2, p. 88-97, 1989.

CHUN, S. S., VATTEM, D. A., LIN, Y. T., & SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, 40(2), p. 809-816. 2005.

DA COSTA, C. T., HORTON, D., & MARGOLIS, S. A. Analysis of anthocyanins in foods by liquid chromatography, liquid chromatography–mass spectrometry and capillary electrophoresis. **Journal of Chromatography A**, 881(1), p. 403-410, 2000.

DA SILVA, NEUSELY. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3.ed., São Paulo Varela, 2007. 552p.

Decreto-Lei n.º 217/2008 de 11 de Novembro. **Diário da República n.º 219/2008 – I Série**. Ministério da Agricultura, Desenvolvimento Rural e Pescas. Lisboa. Transpõe para a ordem jurídica interna a Diretiva n.º 2006/141/CE da Comissão de 22 de Dezembro, na parte relativa às fórmulas para latentes e fórmulas de transição, estabelece o respetivo regime jurídico e revoga os Decretos-Lei n.º 220/99 de 16 de Junho, 286/2000 de 10 de Novembro e 138/2004 de 5 de Junho.

DE ALMEIDA, A. C., DE OLIVEIRA, L., DE PAULO, P. D., MARTINS, E. R., SOUZA, R. M., DE FIGUEIREDO, L. D. S., FONSECA, H. C.. Potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de cravo da Índia e alfavacão em carne moída de ovinos contaminados experimentalmente com *S. aureus*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, 20(4), p. 248-251, 2014.

DE MATTOSA, L. L., MARTINS, I. S. Consumo de fibras alimentares em população adulta. **Revista Saúde Pública**, 34(1), p. 50-55. 2000.

DE MORAIS, S. M., CAVALCANTI, E. S., COSTA, S. M., AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Braz. J. Pharmacognosy**, 19(1B), p. 315-320. 2009.

DE VASCONCELOS CATÃO, M. H. C., DA SILVA, M. S. P., DA SILVA, A. D. L., DA COSTA, R. O. Estudos Clínicos com Plantas Medicinais no Tratamento de Afecções Bucais: Uma Revisão de Literatura. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, 14 (4). 2014.

DEVLIEGHERE, F., VERMEIREN, L., DEBEVERE, J., New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**, 14 (4), p. 273 – 285. 2004.

DOMINGUEZ-PERLES, R.; MENA, P.; GARCIA-VIGUERA, C.; MORENO, D.A. Brassica foods as a dietary source of vitamin C: A review. **Crit. Rev. Food Sci. Nutr.**, 54, p. 1076-1091. 2014.

DO NASCIMENTO, M. V. D., GUEDES, A. T. L., SILVA, H. A., DOS SANTOS, V. E. P., DE FRANÇA PAZ, M. C. Avaliação Da Qualidade Microbiológica Da Carne Moída Fresca Comercializada No Mercado Central Em Campina Grande–Pb. **Revista Saúde & Ciência on line**, 3(1), p. 56-68. 2014.

DOS SANTOS, U., DOS SANTOS, B., DA SILVA, G. F., CONSTANT, P., DOS SANTOS, J. A. B. AVALIAÇÃO DE POTENCIAL DE ERVAS MEDICINAIS:

CAPIM-LIMÃO (*Cymbopogon citratus* DC), CHÁ VERDE (*Camellia sinensis* L.) E HIBISCO (*Hibiscus sabdariffa* L.) PARA OBTENÇÃO DE CHÁS SOLÚVEIS. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, 4(4), p. 1399-1408. 2014.

DUTRA DE OLIVEIRA, J. E.; MARCHINI, J. S. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998. 403 p.

EL-NAGGAR, S M. Pollen. Morphology of Egyptian Malvaceae: An assessment of taxonomic value. **Turk J. Bot**, 28, p. 227-240. 2004.

ENGELKE, F. Fitoterápicos e Legislação. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**. 1(1). p. 1015. 2003.

ESTEVES, G. L., DUARTE, M. C., TAKEUCHI, C. Sinopse de *Hibiscus* L. (Malvoideae, Malvaceae) do Estado de São Paulo, Brasil: espécies nativas e cultivadas ornamentais. **Hoehnea**. 41(4): p. 529-539, 2014.

EVERETTE, J. D., BRYANT, Q. M., GREEN, A. M., ABBEY, Y. A., WANGILA, G. W., WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin– Ciocalteu reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 58(14), p. 8139-8144. 2010.

FALCÃO LD, BARROS DM, GAUCHE C., LUIZ M. T. B. Copigmentação intra e intremolecular de antocianinas: uma revisão. **CEPPA**, 21: p. 351-366. 2003.

FAURÉ, M., LISSI, E., TORRES, R., VIDELA, L. A. Antioxidant activities of lignans and flavonoids. **Phytochemistry**, 29(12), p. 3773-3775. 1990.

FORSYTHE, S. J., **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2ª Ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, 2013. 607p.

FRANCIS, F.J. Food colorants: anthocyanins. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 28, (4), p. 273-314, 1989.

FREIRE, M. F. I. Plantas medicinais: a importância do saber cultivar. **Revista científica eletrônica agronomia**. Garça/SP, a. 3, 3ª ed., n.5, 2004.

FRIAS UA, COSTA MCM, FRIAS JAT. Caracterização fitoquímica e avaliação das atividades antibacteriana e anticolinesterásica de extratos de *Banisteriopsis anisandra* A. AMMERJuss. (Malpighiaceae). **Rev. Cubana Plant. Med.** 16(1). p. 60-71. 2011.

FRIMPONG, G., ADOTEY, J., OFORI-KWAKYE, K., KIPO, S. L., & DWOMO-FOKUO, Y. Potential of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* calyces as coloring agent in three pediatric oral pharmaceutical formulations. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**. 4(12), p. 001-007. 2014.

GERMANO, P.M.L; GERMANO, M.I.S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. 4ªed. São Paulo: Manole, 2011.1088p.

GOMIDE, L. A . de M., RAMOS, E . M., FONTES, P. R., **Ciência e Qualidade da Carne fundamentos**. Viçosa, MG: Ed. UFV, 2013. 197p.

HAMAGUCHI, T., ONO, K., MURASE, A., YAMADA, M. Phenolic Compounds Prevent Alzheimer's Pathology through Different Effects on the Amyloid- β Aggregation Pathway. **American journal of pathology**, 175, p. 2557-2565, 2009.

HAMMER, K. A.; CARSON, C.F; RILEY, T.V. Antimicrobial activity of essential oils na other palnt extracts. **Journal of Applied Microbiology**, 86, p.985-990. 1999.

HARBORNE JB, BAXTER H, MOSS GP, edit. **Phytochemical dictionary: handbook of bioactive compounds from plants**. 2nd ed. London: Taylor and Francis; 1999.

HARDISSON, A., RUBIO, C., BAEZ, A., MARTIN, M., ALVAREZ, R., & DIAZ, E. Mineral composition of the banana (*Musa acuminata*) from the island of Tenerife. **Food Chemistry**, 73(2), p. 153-161. 2001.

HAIDA, K. S., BARON, Â., SATOMI HAIDA, K., DE FACI, D., HAAS, J., DA SILVA, F. J. Compostos Fenólicos Totais E Atividade Antioxidante De Duas Variedades De Goiaba E Arruda Phenolic Compounds And Antioxidant Activity Of Two Varieties Of Guava And Rue. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde-USCS**, 9(28). 2011.

HAGIWARA A, MIYASHITA K, NAKANISHI T, SANO M, TAMANO S, KADOTA T, KODA T, NAKAMURA M, IMAIDA K, ITO N, SHIRAI T. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-16-phenylimidazol (4,5-b) pyridine (PhIP) associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2- dimethylhydrazine. **Cancer Letters**, 171. p. 17-25. 2001.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of natural products**, 59(2), p. 205-215. 1996.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Espécies de plantas**, 2015. Disponível em:< <http://teen.ibge.gov.br/mao-na-roda/flora-brasileira/especies-de-plantas>>. Acesso em: 10 de jan. de 2015.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da Produção Pecuária**, 2014. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201403_publ_completa.pdf>. Acesso em: 1 de fev. de 2015.

IOANNIDES-DEMOS, L.L., PICCENNA L., MCNEIL J. J. **Pharmacotherapies for Obesity: Past, Current, and Future Therapies**. J. Obes. 2011.

JAY, J.M. **Microbiologia de alimentos**. 6 ed. Porto Alegre: Artmed, 2005, cap. 25, 517-542 p.

JUNIOR, V. F. V., PINTO, A. C., MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura. **Química nova**, 28(3), p. 519-528. 2005.

KIESSOUN, K, SOUZA, A, MEDA, N T R, COULIBALY, A Y, KIENDREBEOGO, M, LAMIEN-MEDA, A, LAMIDI, M, MILLOGORASOLODIMBY, J, NACOULMA, O G. Polyphenol contents, antioxidant and anti-inflammatory activities of six Malvaceae species traditionally used to treat hepatitis B in Burkina Faso. **Eur. J. Sci. Res**, 44 (4), p. 570-580. 2010.

LACERDA, J. R. C., SOUSA, J. D. S., SOUSA, L. C. F. S., BORGES, M. D. G. B., FERREIRA, R. T. F. V., SALGADO, A. B., SILVA, M. J. S. D. Conhecimento popular sobre plantas medicinais e sua aplicabilidade em três segmentos da sociedade no município de Pombal-PB. **Agropecuária Científica no Semiárido**, 9(1), p. 14-23. 2013.

LEE SJ, UMANO K, SHIBAMOTO T, LEE KG. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chem**. 91(1), p. 131-7. 2005.

LIN, H.; CHAN, K.; SHEU, J.; HSUAN, S.; WANG, C.; CHEN, J. *Hibiscus sabdariffa* leaf induces apoptosis of human prostate cancer cells *in vitro* and *in vivo*. **Food Chem**. 132, p. 880-891. 2012.

LIMA, A. P. L., GROSSO, E. D. S. B., FERREIRA, G., ANDRADE, M. C. Efeito Antimicrobiano do Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) sobre Cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* Isoladas de Pacientes de um Hospital Escola do Sul de Minas. **Revista ciências em saúde**, 4(2), p. 55-63. 2014.

LIMA, V. L. A. G. D., MÉLO, E. D. A., MACIEL, M. I. S., LIMA, D. E. Avaliação do teor de antocianinas em polpa de acerola congelada proveniente de frutos de 12 diferentes aceroleiras (*Malpighia emarginata* DC). **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 2003.

LOGUERCIO, A.P.; SILVA, W.P.; ALEIXO, J.A.G. Condições Higiênico-sanitárias no Processamento de Carne Bovina Moída. **Higiene Alimentar**, 16 (98), p. 63-66, 2002.

LOPES, T., XAVIER, M., QUADRI, M. G., QUADRI, M. Antocianinas: uma breve revisão das características estruturais e da estabilidade. **Current Agricultural Science and Technology**, 13(3). 2012.

LORENZI, H.E.; MATOS, F.J.D.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 512p.
LOTTENBERG, A. M. P. Características da dieta nas diferentes fases da evolução do diabetes melito tipo 1. **Arq. bras. endocrinol. metab**,52(2), p. 250-259. 2008.

- LUZ, F. J. F.; SÁ SOBRINHO, A. F. Vinagreira (*Hibiscus sabdariffa*). In: CARDOSO, M. O. (Coord.) Hortaliças não-convencionais da Amazônia. Brasília: Embrapa – SPI. Manaus: **Embrapa CPAA**, p. 63-69. 1997.
- MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA, J. V., GRYNBERG, N. F., ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, 25(3), p. 429-438. 2002.
- MACIEL, M. J., PAIM, M. P., CARVALHO, H. H. C., WIEST, J. M. Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 71(3), p. 462-470. 2012.
- MARINHO, M. G. V., SILVA, C. C., ANDRADE, L. H. C. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de caatinga no município de São José de Espinharas, Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, 13(2), p. 170-182. 2011.
- MARQUES, M. C. A., BAGGIO, C. H., SANTOS, É. P. **Plantas medicinais utilizadas pela Pastoral da criança de Almirante Tamandaré-Paraná-BR**. 1ª ed. 2014. 158p.
- MATOS, V. D. S. R., GOMES, A. P. P., DOS SANTOS, V. A., FREITAS, F., DA SILVA, I. D. M. M. Perfil sanitário da carne bovina in natura comercializada em supermercados. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, 71(1), p.187-192. 2012.
- McDONALD, P.; EDWARD, R.A.; GREENHALGH, J.E.D. **Nutrición animal**. Zaragoza: Acríbia, 1999. 576p.
- MEHDI ANSARI, TOUBA ESLAMINEJAD, ZARRIN SARHADYNEJAD AND TAHEREH ESLAMINEJAD, “An Overview of the Roselle Plant with Particular Reference to Its Cultivation, Diseases and Usages”, **Europ Jour of Med Plan**, 3(1), p. 135-145, 2013.
- MERKEN HM, BEECHER GR. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. **Jour Agric Food Chem**, 48 (3). P. 577-99, 2000.
- MOTTA MRA, BELMONTE MA, PANETTA JC. Avaliação microbiológica de amostras de carne moída comercializada em supermercados da região oeste de São Paulo. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, 14 (78/79), p. 59-62, 2000.
- MUKAI, K., MORIMOTO, H., OKAUCHI, Y., NAGAOKA, S. I. Kinetic study of reactions between tocopheroxyl radicals and fatty acids. **Journal Lipids**, 28(8), p. 753-756, 1993.
- NACZK M, SHAHIDI F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal Chromatogr A**; 1054 (1/2), p. 95-111, 2004.

- NESPOLO, C. R., DE OLIVEIRA, F. A., PINTO, F. S. T., OLIVERA, F. C. **Práticas em Tecnologia de Alimentos**. Porto Alegre: Artmed, 2015, 203p.
- NOLLA, D.; SEVERO, B.M.A.; MIGOTT, A.M.B. **Plantas medicinais**. 2 ed. Passo Fundo: UPF, 2005, 72p.
- OLIVEIRA, J.E.D. DE; MARCHINE, J.S. **Ciências nutricionais**. São Paulo: Sarvier, 1998, 403p.
- OMOBUWAJO, T.O. SANNI, L.A. BALAMI, Y.A. "Physical properties of sorrel (*Hibiscus sabdariffa*) seeds", **Journal of Food Engineering**. 45 p. 37-41, 2000.
- OMONI, A. O.; ALUKO, R. E. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. **Food Science & Technology**, 16(8), 344-350, 2005.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (O.P.S.). Cultura medica tradicional. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, 98 (4), p. 373-377, 1985.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD (O.P.S.). Cultura medica tradicional. **Boletín de la Oficina Sanitaria Panamericana**, 108 (1), p. 77-80, 1990.
- PARK, Y.K.; KOO, M.H.; CARVALHO, P.O. Recentes progressos dos alimentos funcionais. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 31 (2), p. 200-206, 1997.
- PARDI, M. C.; SANTOS, I. F. dos; SOUZA, E. R. de; PARDI, H. S. **Ciência, higiene e tecnologia da carne. v. 1. Ciência e higiene da carne. Tecnologia da sua obtenção e transformação**. Goiânia: CEGRAF-UFG, 2006.
- PASA MC, AVILA G. Ribeirinhos e recursos vegetais: A etnobotânica em Rondonópolis, Mato Grosso, Brasil. **Interações**.11(2), p. 195-204. 2010.
- PETER E., MASHOTO, K. O., RUMISHA, S. F., MALEBO, H. M., SHIJA, A., ORIYO, N. Iron and Ascorbic Acid content in *Hibiscus sabdariffa* Calyces in Tanzania: Modelling and Optimization of Extraction Conditions. **International Journal of Food Science and Nutrition Engineering**, 4(2), p. 27-35, 2014.
- PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, 63, p. 1035-1042, 2000.
- POURMORAD, F., HOSSEINIMEHR, S. J., SHAHABIMAJD, N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. **African journal of biotechnology**, 5(11), p. 1142-1145, 2006.
- PRADO, C.S. SANTOS W.L.M., CARVALHO, C.R., MOREIRA, E.C., COSTA J.O. Atividade antimicrobiana de bactérias lácticas de embutidos curados frente a *Listeria monocytogenes*. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, 52 (4), p. 417-23, 2000.

PROESTOS, C., CHORIANOPOULOS, N., NYCHAS, G. J. E., KOMAITIS, M. J. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Agric. Food Chem.**, 53, p. 1190-1195, 2005.

Regulamento (UE) n.º 1169/2011 do Parlamento Europeu e do Conselho de 25 de Outubro. Jornal Oficial da União Europeia n.º L 304. Estrasburgo. **Relativo à prestação de informação aos consumidores sobre os géneros alimentícios**, que altera o Regulamento (CE) n.º 1924/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Dezembro e o Regulamento (CE) n.º 1925/2006 do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Dezembro e revoga as Diretiva 87/250/CEE da Comissão, Diretiva 90/496/CEE do Conselho de 24 de Setembro, Diretiva 1999/10/CE da Comissão de 8 de Março, Diretiva 2000/13/CE do Parlamento Europeu e do Conselho de 20 de Março, Diretiva 2002/67/CE da Comissão de 18 de Julho, Diretiva 2008/5/CE da Comissão de 30 de Janeiro e o Regulamento (CE) n.º 608/2004 da Comissão de 31 de Março

RIBEIRO, M. D. A., STAMFORD, T. L. M., EULÁLIO-FILHO, C. Valor nutritivo de refeições coletivas: tabelas de composição de alimentos versus análises em laboratório. **Revista de Saúde Pública**, 29(2), p. 120-126, 1995.

RICE, R. P., L. W. RICE, H. D. TINDALL. **Fruit and vegetable production in warm climates**. Macmillan Education Ltd. London, U.K., 1990.

ROSS I.A. *Hibiscus sabdariffa*. In **Medicinal Plants of the World**. Vol 1, 2nd Edition, Humana Press: New Jersey, p. 267-275, 2003.

SANTURIO, D. F., COSTA, M. M., MABONI, G., CAVALHEIRO, C. P., SÁ, M. F., POZZO, M. D., FRIES, L. L. M. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, 41(6), p. 1051-1056, 2011.

SHAHIDI F, NACZK M. **Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications**. Lancaster: Technomic; 1995.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects of spices. **Journal of Food Safety**, Westport, 6 (1), p.29-44, 1984.

SILVA, A. F. **Levantamento do uso de plantas medicinais na população do centro urbano e zona rural denominada Lagoa dos Martins no município de Piumhi – MG**. Lavras, UFLA, 2003. 60p. (Monografia de conclusão de curso de pós-graduação Lato Sensu em gestão e manejo ambiental de sistemas agroflorestais).

SIE, R. S., CHARLES, G., DIALLO, H. A., KONE, D., TOUEIX, Y., DJE, Y., BRANCHARD, M. Breeding of *Hibiscus sabdariffa* L.: Evaluation of resistance to *Fusarium oxysporum* Schlecht. Emend. Snyd. and Hans in two varieties. Agriculture and Biology **Journal of North America**, 2(1), p. 125-133, 2011.

SILVA jr. E. A. da.; **Manual de controle higiênico-sanitário em serviços de alimentação.** 6ª Ed. São Paulo: Livraria Varela, 2013.

SILVA, R. B. L. **A etnobotânica de plantas medicinais da comunidade quilombola de Curiaú,** Macapá-AP, Brasil. Belém, PA. 2002. 172p. Dissertação (Mestrado em Agronomia). Universidade Federal Rural da Amazônia.

SOARES, S. E. Ácidos fenólicos como antioxidantes. **Rev. Nutr.** 15 (1), p. 71-81, 2002.

SOLOMONS, N. W. M. E. SHILS, J. A. OLSON, M. SHIKE (Eds.). **Modern nutrition in health and disease.** Philadelphia, PA: Lea & Febiger. 2, p. 940-945, 1994.

SOUSA, T. M., NETO, A. C., HERNANDES, T., SOUTO, P. C. S. Microrganismos patogênicos e indicadores de condições higiênico-sanitária em carne moída comercializada na cidade de Barra do Garças, MT. **Acta Veterinária Brasileira**, 6(2), p. 124-130. 2012.

STRINGHETA, P.C. **Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas de inflorescência de capim-gordura (*Melinis minutiflora* Pal. de Beauv.).** 138p. Tese (Doutorado) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas. 1991.

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

TEIXEIRA NETO, F. **Necessidades nutricionais.** In: Riella, M.C. Suporte Nutricional Parenteral e Enteral. 2. ed. Rio de Janeiro: editora guanabara koogan s.a., 1993. 55-66p.

TERCI, D. B. L. Aplicações analíticas e didáticas de antocianinas extraídas de frutas. 2004. 213 f. Tese (Doutorado em Química)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

TOMAZZONI, M.I.; NEGRELLE, R.R.B.; CENTA, M.L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapeuta. **Texto & Contexto Enfermagem**, 15 (1), p.115-21, 2006.

TULEY, L. Functional foods: the technical issues. **Food Manufacture**, 70 (4), p. 30-32, 1995.

TORRES, E. A. F. S., CAMPOS, N. C., DUARTE, M., GARBELOTTI, M. L., PHILIPPI, S. T., RODRIGUES, R. S. M. Composição centesimal e valor calórico de alimentos de origem animal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 20 (2), p. 145-150. 2000.

TUROLLA M.S.R., NASCIMENTO E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, 42(2) p. 289-306, 2006.

VEIGA JR, V. F., PATITUCCI, M. L., PINTO, A. C. Controle de autenticidade de óleos de copaíba comerciais por cromatografia gasosa de alta resolução. **Química Nova**, 20, p. 612-615, 1997.

VEIGA JÚNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, 28, (3). p. 519-528, 2005.

YANG, L., GOU, Y., ZHAO, T., ZHAO, J., LI, F., ZHANG, B., WU, X. Antioxidant capacity of extracts from calyx fruits of roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **African Journal of Biotechnology**, 11(17), p. 4063-4068, 2014.

YUN, J.W..Possible anti-obesity therapeutics from nature – A review. **Phytochemical**, 71, p.1625–1641, 2010.

WATSON, R., PREEDY, V., ZIBADI, S., Polyphenols in Human Health and Disease, **Academic Press**: San Diego, USA. 2014.

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 hidroperoxideinduced hepatic toxicity in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 38, p.411-416, 2000.

WOOTTON-BEARD, P. C., MORAN, A., RYAN, L. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after *in vitro* digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. **Food Research International**, 44(1), p. 217-224, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Study group on diet, nutrition and prevention of chronic diseases**. Geneva, (WHO - Technical Report Series, 797), 1990.

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	165039

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., Lami, Porto Alegre, 11.VI. 2010, Vera Lúcia ICN (165039).

Sílvia Maria Marodin

Bióloga CRBio Nº 17268-03D, mestre em Botânica, área de taxonomia