

# **ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DEL EXTRACTO DE *HIBISCUS SABDARIFFA* (L) SOBRE MICROORGANISMOS CONTAMINANTES DE ALIMENTOS**

*Ana Silvia Falco M<sup>\*1</sup>, José Luis Rodríguez S<sup>1,2</sup>, Sheyla Palacios<sup>1</sup>, Lisandra Alvarez<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>*Instituto de Investigaciones para la Industria Alimenticia. Carretera al Guatao km 3½, Habana, C.P. 19200 E-mail: silviaf@iia.edu.cu*

<sup>2</sup>*Dpto. Alimentos. Instituto de Farmacia y Alimentos, Universidad de La Habana, CP 13600, Cuba.*

*Recibido: 02-03-2024 / Revisado: 31-03-2024 / Aceptado: 01-04-2024 / Publicado: 31-08-2024*

## **RESUMEN**

La composición química de los extractos de cálices de jamaica depende de factores como el clima, la variedad genética o el tipo de suelo, por lo que no existe homogeneidad en los valores que se refieren en la literatura tanto para su efecto antioxidante como para la actividad antimicrobiana por lo que se recomienda caracterizar analíticamente los cálices objeto de estudio. En Cuba para compensar la limitada diversidad genética que existe y motivar a la población hacia su consumo se realizan estudios que permitan la obtención de variedades autóctonas de *H. sabdariffa* a partir de la variedad Yersy de

origen mexicano. El presente trabajo tuvo como objetivo estudiar la actividad antimicrobiana y la concentración mínima inhibitoria del extracto acuoso de *H. sabdariffa*, L de la variedad cubana *Dogo* frente a microorganismos contaminantes de alimentos: *S. aureus*; *B. subtilis*; *E. coli*; *S. enteritidis* y *A. niger*

**Palabras clave:** *Hibiscus sabdariffa*, actividad antimicrobiana

## ABSTRACT

### Antimicrobial activity of *Hibiscus sabdariffa* (L) extract on food contaminating microorganisms.

The chemical composition of hibiscus calyx extracts depends on factors such as climate, genetic variety or type of soil, so there is no homogeneity in the values reported in the literature for both its antioxidant effect and activity antimicrobial, so it is recommended to analytically characterize the calyces under study. In Cuba, to compensate for the limited genetic diversity that exists and motivate the population towards its consumption, studies are carried out to obtain native varieties of *H. sabdariffa* from the Yersy variety of Mexican origin. The objective of this work was to study the antimicrobial activity and the minimum inhibitory concentration of the aqueous extract of *H. sabdariffa*, L of the Cuban variety Dogo against food contaminating microorganisms: *S. aureus*; *B. subtilis*; *E.coli*; *S. enteritidis* and *A. niger*

**Key words:** *Hibiscus sabdariffa*, antimicrobial activity

## INTRODUCCIÓN

*Hibiscus sabdariffa*, L se considera una planta con gran potencial en la industria alimentaria debido al color rojo brillante que presentan sus cálices, a su sabor ácido y a sus demostrados efectos sobre la salud. Se ha confirmado que su consumo en forma de infusión produce efecto hipoglucemiante, hipotensor, diurético y antioxidante. Recientemente se ha estudiado la acción antimicrobiana atribuida fundamentalmente a las antocianinas y los compuestos fenólicos presentes en los extractos de jamaica (1,2,3,4).

Ha sido demostrado el efecto inhibitorio del extracto hidroalcohólico frente a bacterias nosocomiales con marcada resistencia a los antibióticos como *S. aureus* y *K. pneumoniae*. También, se obtuvo similar resultado frente a cepas multirresistentes de *Salmonella sp*, inoculadas en vegetales frescos. El efecto ha sido imputado a la elevada presencia de compuestos fenólicos. (5).

La composición de los extractos de cálices de jamaica varía según diferentes factores como el clima, la variedad genética o el tipo de suelo. En Cuba se han obtenido variedades autóctonas de *H. sabdariffa* a partir de la variedad Yersy de origen mexicano, con la finalidad de compensar la limitada diversidad genética que existe y motivar a la población hacia su consumo (6). Como los valores referidos en la literatura para la composición de los extractos de las diferentes variedades no son homogéneos, se recomienda caracterizar desde el punto de vista químico los cálices objeto de estudio (7,8).

El presente trabajo se propone evaluar la actividad antimicrobiana del extracto acuoso de *H. sabdariffa*, L de la variedad cubana Dogo y determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración mínima bactericida de algunos microorganismos contaminantes de alimentos como: *S. aureus*; *B. subtilis*; *E. coli*; *S. Enteritidis* y *A. níger*

## MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención del extracto (EHS) y determinación de antocianinas: los cálices secos y molidos se obtuvieron en la finca de plantas medicinales del Centro de Investigaciones y Desarrollo de Medicamentos (CIDEM) de la Habana.

Para la extracción de las antocianinas se pesaron 200 g de polvo de cálices y se adicionó agua en proporción 1:10. La mezcla se mantuvo en maceración durante 4 h a temperatura ambiente en una zaranda a 200 rpm y luego se homogeneizó en un equipo Ultra Turrax T25 a velocidad de 12000 min<sup>-1</sup> por 2 min y se centrifugó por 10 min a 3000 min<sup>-1</sup>(8). El sobrenadante se colectó en un frasco volumétrico.

El contenido de antocianinas se determinó por el método diferencial de pH empleando dos sistemas buffer (9). Se expresó como mg de cianidina 3 glucósido/ 100 g de flor de jamaica (b.s). Los compuestos fenólicos se evaluaron mediante el procedimiento de Slinkard y Singleton y fueron

expresados como mg de ácido gálico/100 g de flor de Jamaica (b.s) (10).

La actividad antimicrobiana del extracto se evaluó frente a diferentes microorganismos de referencia: *S. aureus* ATCC 25923; *B. subtilis* ATCC 6633; *E. coli* ATCC 25922; *S. Enteritidis* ATCC 13036 y *A. níger* ATCC 16404 mediante el método de difusión en agar con discos de papel. Se determinaron la concentración mínima inhibitoria (CMI) y la concentración mínima bactericida (CMB) para cada microorganismo (11,12).

Las concentraciones (% v/v) de extracto empleadas en el estudio fueron: 25; 12,5; 6,25 y 3,12. Los inóculos se prepararon en solución de cloruro de sodio (0,85 %) a partir de cultivos de 18 - 20 h de crecimiento y las concentraciones ( $10^6$  ufc/mL) se ajustaron mediante escala de McFarland.

Las suspensiones microbianas (500  $\mu$ L) se diseminaron sobre la superficie de placas con Agar Müeller Hinton y se colocaron los discos de papel de 6 mm de diámetro con 10  $\mu$ L de cada extracto. Como control positivo se empleó ampicilina (1%  $m/v$ ) para las bacterias y fluconazol (5 %  $m/v$ ) para el hongo; como control negativo se utilizó agua destilada estéril (12).

Se midieron manualmente los halos de inhibición y se interpretaron según escala de Duraffourd. La Concentración mínima inhibitoria (CMI) y la Concentración mínima bactericida (CMB) se determinaron empleando el método de macrodilución en tubos (12,13). Los ensayos se realizaron por triplicado.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La intensidad del color en las variedades de *H. sabdariffa* de cálices rojos, está relacionada con el contenido de antocianinas que presentan. El extracto de la variedad Dogo se caracterizó por un color rojo vino intenso y un contenido de antocianinas de 818,9 mg de cianidina 3 glucósido/100 g de

cáliz (b.s), valor semejante al referido para la variedad mexicana Yersey acriollada de la cual deriva (14). Otros autores refieren valores entre 502,3 y 622,9 mg/100g b.s para variedades comerciales como Guerrero, China y Sudán (15). Por otro lado, se encontró que el contenido de fenoles totales de la variedad cubana también es similar al informado para variedades de Centroamérica y superior a los de procedencia asiática (Tabla 1). Esta diferencia se justifica por la influencia de factores de tipo fitogenéticos o ambientales que pueden influir sobre el perfil antioxidante de los extractos de *H. sabdariffa* (15). Diferentes autores han demostrado que los ácidos fenólicos son los que brindan la mayor capacidad antioxidante a los extractos de cálices de jamaica y dentro de estos los más significativos son el ácido clorogénico, el protocatéquico y gálico (16,17,18).

**Tabla 1.** Contenidos de antocianinas y compuestos fenólicos de los cálices de *H. sabdariffa*, Lvar. Dogo

Compuesto	(mg /100g b.s)
Antocianinas <sup>a</sup>	818,9 (40,9)
Fenoles totales <sup>b</sup>	2 462,5 (113,1)

Los valores informados corresponden a las medias y entre paréntesis la desviación estándar (n = 4), <sup>a</sup> expresado como cianidina-3-glucósido, <sup>b</sup> expresado como ácido gálico

En la Tabla 2 se muestran los resultados de la actividad antimicrobiana del extracto de la variedad Dogo, la cual puede considerarse como marcada (18) y es atribuida a la elevada concentración de antocianinas y compuestos fenólicos presentes en esta variedad. Resultados similares fueron reportados por otros autores (19).

Como se aprecia la concentración de 3,1 % v/v de extracto no tuvo ningún efecto sobre los microorganismos y no se observaron zonas de inhibición alrededor del disco. Sin embargo, al incrementar la concentración a 6,25 % v/v se observaron zonas claras con diámetros entre 15 y 19 mm

alrededor del disco para *S. aureus*, *B. subtilis* y *S. Enteritidis*.

Para esta misma concentración *E. coli* y *A. niger* presentaron halos menores (10mm) lo cual indica una mayor resistencia.

**Tabla 2.** Actividad antimicrobiana del extracto de *Hibiscus sabdariffa*(L) var. Dogo

Microorganismo	Extracto (% v/v)			
	25	12,5	6,25	3,12
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	(+++)	(++)	(++)	(-)
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	(+++)	(++)	(++)	(-)
<i>E. coli</i> ATCC 25922	(+++)	(++)	(+)	(-)
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13036	(+++)	(++)	(++)	(-)
<i>A. niger</i> ATCC 16404	(+++)	(++)	(+)	(-)

Leyenda: (-) no hay inhibición; (+) sensible; (++) muy sensible; (+++) sumamente sensible

Todos los microorganismos mostraron una fuerte inhibición con concentraciones de 12, 5% v/v comparable a la de los controles negativos (ampicilina y fluconazol). Resultados similares obtuvieron otros autores con 10 % v/v de extracto, que produjeron zonas de inhibición promedio de 12,6 mm para algunas bacterias (18,19).

La acción antimicrobiana de los extractos de jamaica puede explicarse por el efecto conjunto de varios compuestos activos, entre ellos antocianinas (delfinidina-3-glucósido y cianidina-3-sambubiósido); flavonoides y sus respectivos glucósidos (hibiscetina y gossypetina); ácidos fenólicos (ácido protocatéquico y gálico) y algunos fitosteroles como  $\beta$ -sitoesterol y ergoesterol (19-21).

Los resultados obtenidos para las CMI y CMB son mostrados en la Tabla 3, donde se observa que los valores de CMI de todos los microorganismos estudiados estuvieron en el rango entre 200 y 300  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de extracto, que están en el entorno de lo reportado por otros autores que comprobaron que el extracto de *H. sabdariffa* L tenía fuerte actividad frente a bacterias Gram negativas como *E. coli*, *E. aerogenes*, *E. cloacae*, *K. pneumoniae*, y *P. aureauginosa* con valores de CMI en el intervalo de 100 a 512  $\mu\text{g} / \text{mL}$  de extracto (18-21).

En la Tabla 3 se observa también, que el valor de CMB se encuentra entre 250 y 350  $\mu\text{g} / \text{mL}$ , lo que significa que el extracto de *H. sabdariffa* var. Dogo logra eliminar el 99,9 %

de los microorganismos estudiados a concentraciones entre 250 y 350 µg / mL.

**Tabla 3.** Concentración mínima inhibitoria del extracto de *H. sabdariffa*, *L. var Dogo* (µg de extracto/mL)

Microorganismo	CMI	CMB
<i>E. coli</i> ATCC 25922	300	350
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	200	250
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13036	250	250
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	250	300
<i>A.niger</i> ATCC 16404	300	350

Estos resultados confirman que la variedad cubana Dogo presenta un potencial antimicrobiano elevado, semejante al de las centroamericanas que son las que mayor contenido de antocianinas presentan.

## CONCLUSIONES

El extracto acuoso de la variedad cubana Dogo presentó un contenido de antocianinas de 818,9 µg / mL expresado como cianidina 3 glucósido y de fenoles totales de 2462,5 µg ácido gálico / mL. El extracto presentó marcada actividad antimicrobiana frente a *St. aureus*; *S. Enteritidis*; *B. subtilis*; *E. coli* y *A. niger* en el rango de concentraciones entre 6,25 y 12,5 % v/v.

Los valores de CMI para estos microorganismos estuvieron en el intervalo de 200 a 300 µg de antocianinas / mL y las CMB entre 250 y 350 µg de antocianinas / mL.

## REFERENCIAS

1. Sulochanamma G, Madhusudhan RD, Prabhakara RP, Balaswamy K. Development of a low calorie ready to serve beverage from *Hibiscus cannabinus L.* Biomed. J. Sci. Tech. Res 2018; 11 (2).
2. Mahmoud R, Zahra DA, Hala B. Effect of Roselle Extract (*H. sabdariffa*) on stability of carotenoids, bioactive compounds and antioxidant activity of yoghurt fortified with carrot juice (*D. carota L.*). W J Dairy Food Sci 2017; 12 (2): 94-101
3. Padmaja H, Sruthi S, Vangalapti M. Reseña sobre *H. sabdariffa*: Una planta valiosa. J. Pharm. Life Sci 2014; 5 (8): 3747-52.
4. Mozaffari KH, Ahadi Z, Barzegar K. El efecto del té verde y té agrio (*H.sabdariffa*, L) sobre la presión arterial de pacientes con diabetes tipo 2: Un ensayo clínico aleatorizado. J Diet Suppl 2013; 10: 105-15.
5. Djeussi D, Noumedem J, Seukep J, Fankam A, Voukeng I, Tankeo S, Nkuete A, Kuete, V. Antibacterial activities of selected edible plants extracts against multidrug-resistant Gram-negative bacteria. BMC complement Altern Med 2013; 13(164):1-8.
6. González M. Descriptores para la caracterización y registro de variedades cubanas de flor de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*). Cult. trop 2021; 35: 90-3.
7. Sekar M, Mohd H, Ahmad F, Mohamed S, Mohamad N, Nafiz M, Syafiq M. Br Antibacterial Activity of the Methanolic Extract of *Hibiscus sabdariffa* leaves and fruits. Microbiol. Res 2015; 10(5): 1-6.
8. Galicia FL, Salinas Y, Espinoza B, Sánchez C. Caracterización fisicoquímica y actividad antioxidante de extractos de Jamaica (*Hibiscus sabdariffa L.*) nacional e importada. Rev. Chapingo. Ser: Horti 2008; 14(2):121-29.

9. AOAC. Total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method. Official Methods of Analysis of AOAC International, 18th Ed., (H. Horowitz.) Washington; 2005.
10. Slinkard K, Singleton VL. Total Phenol Analysis: Automation and Comparison with Manual Methods. Am. J. Enol. Vitic 1977; 28(1): 49-55.
11. Duraffourd C, D'hervocourt L, Lapraz JC. Fitoterapia Clínica. Editorial Masson, S.A., Barcelona; 2002.
12. Bauer AW, Kirby WM, Sherris JC, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. Am. J. Clin Pathol 1966; 45(4): 493-6.
13. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing”, 21st international supplements, document M100-S21, Wayne, Pennsylvania; 2011.
14. Salinas M, Zúñiga HL, Jiménez DV, Serrano A, Sánchez F. Color en cálices de Jamaica (*Hibiscus Sabdariffa* L. L.) y su relación con características fisicoquímicas de sus extractos acuosos. Rev. Chapingo. Ser: Hortic 2012; 18: 395-407.
15. Reyes LA, Salinas MY, Ovando CM, Arteaga GM, Martínez PMD. Analysis of phenolic acids and antioxidant activity of aqueous extracts of Jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.) varieties with calyxes of different colors. Agrocienc 2015; 49: 277-90.
16. Morales CM, Hernández MJ, Leyva R.G, Salinas MY, Soto RL, Castro RJ. Actividad antimicrobiana y caracterización fenólica de cálices de Jamaica. Med. Plan. Res 2013; 7(31):2319–22.
17. Fernández AS, Rodríguez MC, Beltrán DR, Pasini F, Joven J, Micol V, Fernández GA. Quantification of the polyphenolic fraction and in vitro antioxidant and in vivo anti-hyperlipidemic activity of *H. sabdariffa* aqueous extract. Food Res. Inter 2011; (5): 1490-95.
18. Che-Yi Ch, Mei-Chin Y. Antibacterial effects of Roselle calyx extracts and protocatechuic acid in ground beef and apple juice. Foodborne Pathog Dis 2009; (6): 201-06.
19. Zarkani, A. Antimicrobial activity of *H. sabdariffa* and *S. grandiflora* extracts against some G-ve and G+ve strains. Banat's J Biotechnol 2016; 7(13): 17-24.
20. Olaleye MT. Citotoxicidad y actividad antibacteriana del extracto metanólico de *Hibiscus sabdariffa*. J. Med. Plan 2007; 1 (1): 9-13.
21. Nahuatt GL, Sumaya MT, Jiménez R, Sánchez HL, Bautista Rosales PU, Medina C, Guzmán CJ. Actividad hemolítica, antimicrobiana y antioxidante de extractos acuosos de cálices de jamaica. Biocienc 2020; (7). <http://revistabiociencias.uan.edu.mx>