

UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

VANESSA GOMES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA,
MODULATÓRIA E TOXICOLÓGICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES
DE *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae).**

Juazeiro do Norte – CE
2019

VANESSA GOMES FERREIRA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA,
MODULATÓRIA E TOXICOLÓGICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES
DE *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae).**

Artigo de Pesquisa apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues.

VANESSA GOMES FERREIRA

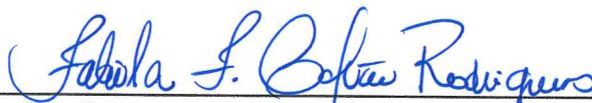
**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA,
MODULATÓRIA E TOXICOLÓGICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES
DE *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae).**

Artigo de Pesquisa apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues.

Data de aprovação: 11/12/2019

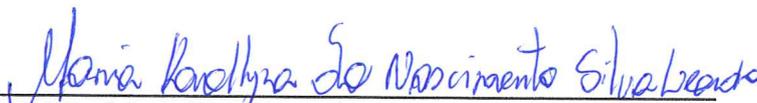
BANCA EXAMINADORA



Prof^a. Dra. Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues
Orientadora



Prof^a. Ma. Rakele Olinda Macedo da Silva
Examinadora 1



Prof^a. Ma. Maria Karollyna do Nascimento Silva Leandro
Examinadora 2

AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO E DAS ATIVIDADES ANTIBACTERIANA, MODULATÓRIA E TOXICOLÓGICA DO EXTRATO ETANÓLICO DAS FLORES DE *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae).

Vanessa Gomes Ferreira¹, Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues².

RESUMO

Este estudo teve como objetivo caracterizar quimicamente o extrato etanólico das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) e investigar seu potencial antibacteriano, toxicológico e modulatório. Para produção do extrato foram utilizadas as flores do *Hibiscus* obtidas em um mercado de produtos naturais na cidade de Crato-CE e submersas em etanol durante 72h. Para identificar o perfil químico foram utilizados reagentes específicos e posteriormente a detecção de componentes bioativos através da alteração de cor e/ou formação de precipitado. As linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12624) e *Bacillus cereus* (ATCC 33018), foram utilizadas na determinação da concentração inibitória mínima pelo método de microdiluição. No teste de modulação foram utilizados os antibióticos aminoglicosídeos e β -lactâmicos com as cepas de *S. aureus* (ATCC 12624) e *P. aeruginosa* (ATCC 15442), a toxicidade foi avaliada pelo microcrustáceo *Artemia salina* frente ao extrato nas concentrações de 1000 $\mu\text{g/mL}$ a 10 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados do perfil químico demonstraram presença de catequinas, fenóis, flavonas, flavonóis, flavononas, leucoantocianidinas, tatinos flababênicos e xantonas. A CIM teve como resultado $\geq 1024 \mu\text{g/mL}$ para todas as linhagens; enquanto modulação houve sinergismo de *S. aureus* para cefazolina e gentamicina, e com *P. aeruginosa* modulação sinérgica para cefazolina, gentamicina e amicacina juntamente do extrato etanólico, ao final não foi possível determinar a CL_{50} não sendo identificada nenhuma toxicidade. Contudo, os resultados obtidos sugerem a utilização desse extrato como agregado a antibioticoterapia, podendo ser um composto alternativo no tratamento de doenças.

Palavras-chave: Extrato. Hibisco. Microdiluição. Resistência.

EVALUATION OF CHEMICAL PROFILE AND ANTIBACTERIAL, MODULATORY AND TOXICOLOGICAL ACTIVITIES OF THE ETHANOLIC EXTRACT OF FLOWERS OF *Hibiscus savariffa* L. (Malvaceae).

Vanessa Gomes Ferreira¹, Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues².

ABSTRACT

This study aimed to chemically characterize the ethanolic extract of the flowers of *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) and thus investigate its antibacterial, toxicological and modulatory potential. Hibiscus flowers obtained from a natural products market in the city of Crato-CE and submerged in ethanol for 72h were used to produce the extract. Specific reagents were used to identify the chemical profile and later detection of bioactive components through color change and / or precipitate formation. *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 12624) and *Bacillus cereus* (ATCC 33018) were used to determine the minimum inhibitory

¹Discente de Biomedicina, wannessagomes518@gmail.com, Centro Universitário Doutor Leão Sampaio-UNILEÃO.

²Doutora, fabiola@leaosampaio.edu.br, Centro Universitário Doutor Leão Sampaio-UNILEÃO.

concentration by the microdilution method. In the modulation teste the aminoglycoside and β -lactam antibiotics were used with th strains of *S. aureus* (ATCC 12624) and *P. aeruginosa* (ATCC 15442). strains, toxicity was evaluated *Artemia salina* microcrustacean against the extract at 1000 μg concentrations. / mL at 10 μg / mL. The results of the chemical profile showed the presence of catechins, phenols, flavones, flavonols, flavonones, leucoanthocyanidins, flababen tatines and xanthones. MIC resulted in ≥ 1024 μg / mL for all strains; while modulation there was synergism of *S. aureus* for cefazolin and gentamicin, and with *P. aeruginosa* synergistic modulation for cefazolin, gentamicin and amikacin together with the ethanolic extract, it was not possible to determine the LC_{50} and no toxicity was identified. However, the results suggest the use of this extract as an antibiotic therapy, and may be an alternative compound in the treatment of diseases.

Keywords: Extract. Hibiscus. Microdulation. Resistance.

1 INTRODUÇÃO

Os fitoterápicos podem apresentar funções curativas e profilática auxiliando o tratamento de diversas doenças. Estes são originados exclusivamente de vegetais que possuem constituintes bioativos validados pelos órgãos de vigilância em saúde, sendo assim um componente de grande valor biológico para o indivíduo e tornando-se um método terapêutico alternativo. Diante disso, nos últimos anos houve grande crescimento da procura por fitoterápicos pela população que visa ter qualidade de vida a baixo custo e novas possibilidades de tratamento (MARQUES et al., 2019; MENDONÇA et al., 2018).

Elementos bioativos das plantas são provenientes do metabolismo secundário que diferente do primário, pois possui função de proteção para sua sobrevivência através da relação planta e ambiente, como também função terapêutica. Esses compostos apresentam moléculas complexas, as quais são responsáveis pela ação terapêutica e são obtidos através de extratos ou óleos essenciais, podem apresentar em sua constituição compostos fenólicos que por sua vez possuem ação antioxidante, como também alcalóides e terpenos responsáveis pela ação antimicrobiana e tóxica em defesa vegetal contra animais. Diversas espécies de vegetais presentes no meio ambiente apresentam esses componentes em suas flores, folhas ou frutos assim como *Hibiscus sabdariffa* (AMPARO et al., 2017; MATIAS et al., 2010; ROCKENBACH et al., 2018).

A espécie *Hibiscus sabdariffa* L. é uma planta utilizada para fins medicinais, trazida para o Brasil por escravos africanos é conhecida popularmente por rosélia, azeda-da-guiné ou azedinha. Possui em sua composição compostos químicos benéficos, sendo estes compostos retratados na literatura com ação antioxidante proveniente de compostos fenólicos auxiliando na eliminação de radicais livres, assim como os flavonoides que atuam como função

antimicrobiana na conservação de alimentos e com baixos índices de toxicidade as células do organismo (COELHO; AMORIM, 2019).

Devido à grande procura por fitoterápicos de valor econômico acessível e que possuam contribuição para a saúde da população, as flores de *H. sabdariffa* têm se tornado uma alternativa no cotidiano das pessoas, por ofertar constituintes bioativos que podem promover ações benéficas ao organismo, mas também por ser um recurso acessível e de fácil manipulação. Desse modo, o presente trabalho buscou avaliar as atividades antimicrobiana, modulatória e toxicológica do extrato etanólico das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 TIPO E LOCAL DE ESTUDO

A pesquisa trata-se de um estudo experimental e quantitativo, o qual inclui uma pré - tese para testar uma hipótese. Os resultados obtidos poderão contribuir no aprimoramento de novas pesquisas científicas que podem ter finalidade de descobrir algo inexplorado (DODT et al., 2015). Os experimentos foram realizados no laboratório de microbiologia e bromatologia do centro universitário Doutor Leão Sampaio e no Laboratório de Pesquisas de Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Regional do Cariri –URCA.

2.2 MATERIAL VEGETAL

Foram utilizadas flores desidratadas do *Hibiscus sabdariffa* L, obtidas em um mercado público no período de agosto de 2019 no município de Crato-CE.

2.3 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

Para obtenção do extrato etanólico foi utilizado o processo de extração a frio com etanol P.A. O extrato foi preparado com extração exaustiva das flores (500g) por imersão de 72 horas. Após esse período houve a filtração do extrato e o solvente destilado em evaporador rotativo a vácuo, com rendimento de 16,8% (SIMÕES et al., 2010).

2.3.1 Prospecção Fitoquímica

Os testes fitoquímicos foram utilizados para detectar a presença de metabólitos secundários como: flavonóides e taninos, os testes baseiam-se na observação visual da alteração de cor e/ou formação de precipitado após a adição de reagentes específicos (MATOS, 2009; SIMÕES et al., 2010).

2.4 MATERIAL BACTERIANO

Os micro-organismos utilizados nos testes foram obtidos em parceria com o Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais (LPPN) da Universidade Regional do Cariri (URCA). Foram utilizadas linhagens padrão de bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 10031), e Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 12624) e *Bacillus cereus* (ATCC 33018).

2.5 AVALIAÇÃO ANTIBACTERIANA E CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada em ensaio de microdiluição em caldo com base no CLSI (2015). Ao anteceder o teste, as linhagens bacterianas foram ativadas em meio *Brain heart infusion* (BHI 3,8 %) e mantidas na estufa por 24 horas. Após o primeiro cultivo o inóculo bacteriano foi padronizado a partir de uma suspensão com concentração de aproximadamente de 1×10^8 UFC/mL (turbidez da escala de McFarland). Em seguida, esta suspensão foi diluída em caldo BHI a 10 % então, volumes de 100 μ L foram adicionados e homogeneizados nos poços de uma placa de microdiluição com diluições em série. Em cada poço foi adicionado 100 μ L de solução do extrato já diluído em DMSO, as concentrações finais variaram entre 512 - 8 μ g/mL. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas.

Após 24 h na estufa a 37 °C, a atividade antibacteriana foi detectada através do método colorimétrico, utilizando uma solução indicadora de resazurina sódica (Sigma) em água destilada estéril na concentração de 0,01 % (p/v), 25 μ L desta solução foi adicionada em cada cavidade e as placas ficaram em um período de incubação de 1h em temperatura ambiente. A mudança de coloração azul para rosa, ocorre devido à redução da resazurina, indica o crescimento bacteriano, auxiliando a visualização da CIM, definida como a menor concentração

capaz de inibir o crescimento microbiano, evidenciado pela cor azul inalterada. Os experimentos foram realizados em triplicata (CLSI, 2015).

2.5.1 Atividade moduladora à bactérias

O teste de modulação foi realizado na presença e na ausência do extrato através de microdiluição em triplicata. Para avaliar a atividade moduladora foram utilizados os CIM/ 8 do extrato associado aos antibióticos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) e antibióticos β -lactâmicos (cefalotina e benzilpenicilina). As linhagens bacterianas utilizadas foram *S. aureus* (ATCC 12624) e *P. aeruginosa* (ATCC 15442) sendo inoculadas em BHI a 10% e incubadas em estufa bacteriológica a 37° por 24 horas. O teste foi monitorado com um controle positivo contendo apenas os antibióticos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) e os antibióticos β -lactâmicos (cefazolina e benzilpenicilina) assim como os microrganismos. As concentrações adicionadas das drogas antibacterianas usadas nesse ensaio variaram de 512-0,5 μ g/mL (RODRIGUES et al., 2013).

2.6 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE FRENTE *Artemia salina*

A toxicidade foi testada contra o microcrustáceo através do método proposto por Da Costa et al. (2010). O teste foi realizado em triplicata, com diferentes concentrações que variam de 1000-10 μ g/mL, acompanhado de um controle positivo preparado com água marinha e dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$), e um controle negativo com água marinha e DMSO (Dimetilsufóxido). Após 24 horas foi feita a leitura de larvas sobreviventes. O cálculo da CL_{50} foi realizado por regressão linear, sendo considerado significativo quando $CL_{50} < 1000 \mu$ g/mL.

2.7 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os testes microbiológicos e toxicológicos, foram analisados pelo ANOVA bidirecional seguido pelo teste de Bonferroni utilizando *software Graphpad Prism 6.0*. Os resultados considerados estatisticamente significativos foram aqueles em que $p < 0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A toxicidade do extrato etanólico foi testada contra o microcrustáceo da *Artemia salina*, em triplicata, nas concentrações de 1000 µg/mL a 10 µg/mL. Contudo, não foi possível determinar a CL₅₀ não sendo assim identificada nenhuma toxicidade no extrato.

Os efeitos tóxicos de um produto podem aparecer a longo prazo de acordo com a ingestão ou por interações com fármacos, sendo capaz de levar a um quadro clínico alarmante. Por conter produtos de biotransformação tóxicos, o seu uso acarreta efeitos imediatos no tratamento de enfermidades moderadas, como insônia, constipação, dores nas articulações e outros, porém a utilização ao longo de semanas e/ou meses pode levar a complicações assintomáticas. Plantas medicinais em combinação com fármacos podem potencializar seu efeito, diminuir ou agir de modo oposto ao efeito esperado (SILVEIRA et al., 2008).

No estudo realizado por Jabeur et al., (2017), houve similaridade de seus resultados com os deste estudo, onde o mesmo utilizou de células hepáticas primárias diante do extrato hidroetanólico de *Hibiscus* em concentrações de até 400 µg/mL, o autor se baseou nas diretrizes do instituto nacional de câncer e em seus resultados não houve nenhuma toxicidade.

De acordo com a pesquisa de Lima et al. (2018) que utilizou o chá de *Hibiscus in natura* e industrializados diluídos de acordo com o rótulo e analisados frente a células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*, foram observados resultados semelhante ao desse estudo para com a amostra *in natura* não havendo potencial tóxico e não alterou a divisão celular dos meristemas, no entanto houve potencial tóxico da amostra industrializada a qual demonstrou redução na divisão celular dos meristemas de raízes, levando em consideração o mesmo tempo de exposição dos dois produtos para com as cepas.

Na análise química do extrato do *H. sabdariffa* houve adição de reagentes específicos da e posteriormente observação da cor ou precipitado do material, que pode revelar compostos bioativos existentes no extrato deste estudo, como pode-se observar na Tabela 1. Foi possível detectar presença de: catequinas, fenóis, flavonas, flavonóis, flavononas, leucoantocianidinas, tatinos flababênicos, xantonas e ausência de: antocianidinas, antocianinas e tatinos pirogálicos.

Os dados da Tabela 1 se relacionam com os estudos realizados por Salem, Zolivares-perez e Salem (2014) que confirmam a presença de conteúdo fenólico, antocianinas e flavonoides no extrato aquoso do *Hibiscus*. Relata-se também, nas análises realizadas por Rosa (2013), a qual utilizou de um extrato de polifenóis de *Hibiscus* em diferentes formas e preparações, obtendo resultado final de valores significativos de polifenóis totais e antocianinas totais.

Tabela 1. Análise fitoquímica qualitativa do extrato etanólico das flores de *Hibiscus sabdariffa*.

CONSTITUINTES	RESULTADO
Antocianidinas	-
Antocianinas	-
Catequinas	+
Fenóis	+
Flavonas	+
Flavonóis	+
Flavononas	+
Leucoantocianidinas	+
Tatinos flababênicos	+
Tatinos pirogálicos	-
Xantonas	+

Legenda: - negativo, + positivo.

As atividades antibacterianas do extrato etanólico frio das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae) foram analisados *in vitro* contra as bactérias patogênicas expressas na Tabela 2, é possível perceber crescimento microbiano para todas as cepas, não obtendo efeito do extrato para com as linhagens.

Tabela 2. Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato etanólico das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae).

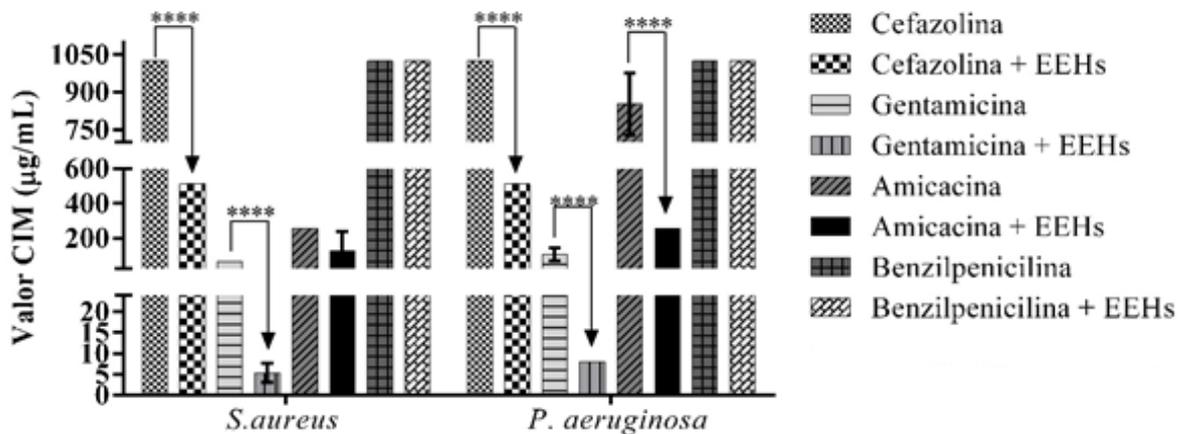
BACTÉRIAS	CIM µg/mL
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (ATCC 10031)	≥ 1024
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 12624)	≥ 1024
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	≥ 1024
<i>Bacillus cereus</i> (ATCC 33018)	≥ 1024
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 25922)	≥ 1024

No estudo de Wemedo et al, (2019), foi utilizada a metodologia de difusão em disco com extratos aquoso seco e alcoólico quente de *H. sabdariffa* onde foi possível perceber maior atividade inibitória do crescimento bacteriano para a *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, contudo o seu material foi coletado em outra estação do ano e na cidade de Port Harcourt, estado de Rivers, local distinto ao do estudo em questão.

Em pesquisas realizadas por Sekar et al. (2015) foi utilizado o extrato metanólico bruto das flores e frutos do *H. sabdariffa* em diferentes concentrações e desenvolvida a análise bacteriana pelo método de difusão em disco, na concentração de 1000 µg/mL houve inibição da cepa de *Pseudomonas aeruginosa* em 7-9 mm, para *S. aureus* 11,9 e 7mm. Contudo o material utilizado por Sekar, foi coletado na vila de Manjoi, Ipoh, Perak, Malásia, sendo um dos locais de origem do *Hibiscus*, o que pôde contribuir para o sucesso em suas análises.

É possível observar no Gráfico 1 que houve resultados significativos dos antibióticos associados ao extrato de *H. sabdariffa* frente as bactérias apresentando sinergismo. Para a cepa de *S. aureus* houve modulação sinérgica com resultados significantes para a cefazolina e gentamicina com o extrato etanólico potencializando seu efeito, sendo indiferente para amicacina e Benzilpenicilina. Contudo, para as cepas de *P. aeruginosa* houve modulação sinérgica sendo mais eficiente o efeito da cefazolina, gentamicina e amicacina juntamente do extrato etanólico, porém para benzilpenicilina não houveram resultados significativos nesse estudo.

Gráfico 1. Atividade moduladora do extrato etanólico das flores de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae).



**** Valor estatisticamente significativo com $p < 0,0001$.

Em outro estudo com a mesma família de *H. sabdariffa*, Menezes (2018) avaliou o potencial modulatório com um extrato hexânico em associação com amicacina e gentamicina, obteve como resultado modulação sinérgica frente a *S. aureus* com amicacina e sinergismo com *P. aeruginosa*, gentamicina e amicacina. Diante disso, é possível perceber correlação e semelhança com os resultados obtidos nesse teste.

Os β -lactâmicos são antibióticos comumente utilizados por possuírem amplo espectro, eficácia terapêutica e poucos níveis de toxicidade, pode conter eficácia em cocos gram positivos e bactérias Gram negativas. Poderá estar ativo em alguns grupos de bactérias como *P. aeruginosa* e da família *Enterobacteriaceae*, e neste estudo houve sinergismo do extrato com a cefazolina pela possível capacidade de inibição da síntese da parede celular, para com as duas linhagens *S. aureus* e *P. aeruginosa*, porém para a benzilpenicilina não houve resultado significativo pela possível facilidade de mutação com as proteínas de ligação à penicilina

(PBPs) diminuindo assim a ação do antibiótico em seu alvo, seu efeito é mais eficaz quando aliado a outro antibiótico (BAPTISTA, 2013).

Antibióticos aminoglicosídeos agem na inibição da síntese proteica, se ligando e agindo na fração 30S de gram negativas como também de gram positivas, o que pode esclarecer o sinergismo da gentamicina para com as linhagens desse teste, no entanto para a amicacina em *S. aureus* não há resultado com relevância, pois possui melhor ação em bactérias gram negativas que é o caso *P. aeruginosa* que por ventura teve resultados relevantes nos testes (CASTANHEIRA, 2013).

Diversas classes de micro-organismos possuem mecanismos para o desenvolvimento de resistência a patógenos, isso ocorre devido a capacidade de codificação genética e sua transferência entre os mesmos, decorrente do aumento do uso de antibióticos. Tendo em vista que produtos naturais, como as plantas medicinais, fornecem agentes antibacterianos como também modificador de antibióticos compreende-se como uma alternativa o uso de produtos de origem vegetal como terapia (AGUIAR et al., 2015).

Com os avanços tecnológicos da indústria farmacêutica, os fitoterápicos se sobressaem como alternativa terapêutica natural, sendo úteis a partir de compostos presentes em órgãos da planta, encontrados em extratos e óleos essenciais que podem expressar interações e atividade antimicrobiana frente ao patógeno, seu alvo possui variabilidade, mas dispõem maior afinidade pela membrana e citoplasma bacterianos (GONÇALVES, ALVES FILHO, MENEZES, 2005; NAZZARO et al., 2013).

4 CONCLUSÃO

Com base no que foi constatado pelas análises do extrato etanólico das flores de *H. sabdariffa*, esse vegetal possui componentes químicos relevantes os quais atuam com finalidade terapêutica de modo a não causar risco tóxico. Evidencia-se ausência da atividade antibacteriana, no entanto na modulação pode-se observar reações significativas da combinação entre o extrato e os antibióticos nas linhagens do teste onde essa união foi capaz de diminuir a CIM do fármaco, vale ressaltar que houveram maiores níveis significativos para *P. aeruginosa*.

Contudo, é importante enfatizar a carência de estudos quanto a atividade modulatória do *H. sabdariffa*, e a atenção para novos estudos com a mesma, pois é uma planta com atividades significativas para a utilização desse extrato como agregado a antibioticoterapia, podendo ser um composto alternativo no tratamento de doenças.

REFERÊNCIAS

- AGUIAR, J. J. S. Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L. **European Journal of Integrative Medicine**. v. 7, n. 2, 2015.
- AMPARO, T. R. et al. Métodos para avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de plantas medicinais: a necessidade da padronização. **Infarma Ciências Farmacêuticas**. v. 30, n. 1, 2017.
- BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de resistências aos antibióticos**. 2013. Tese (Mestrado em ciências farmacêuticas). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia. 2013.
- CASTANHEIRA, B. A. M. G. **Mecanismos de resistências aos antibióticos**. 2013. Monografia (Mestrado integrado em ciências farmacêuticas). Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia. 2013.
- COELHO, C. A. AMORIM, B. S. Expandindo a distribuição geográfica de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): uma espécie naturalizada e negligenciada para a flora brasileira. **Revista Hoehnea**. v. 46, n. 1, 2019.
- CLSI. **Clinical And Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bactéria That Grow Aerobically; Approved Standard- 10 Ed.** Wayne, P. A., CLSI document, 2015.
- DA COSTA, J. G. M. et al. Biological screening of araripe basin medicinal plants using *Artemia salina* Leach and pathogenic bacteria. **Pharmacognosy magazine**. n. 6, v. 24, 2010.
- DODT, R. C. M. et al. Estudo experimental de uma intervenção educativa para promover a autoeficácia materna na amamentação. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**. v.23, n. 4, 2015.
- GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO A; MENEZES H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivo Instituto Biologia**. v. 72, n. 3, 2005.
- JABEUR, I. et al. *Hibiscus sabdariffa* L. As a source of nutrients, bioactive compounds and colouring agents. **Food research international**, v. 100, n. 1, 2017.
- LIMA, M. V. S. et al. Análise da citotoxicidade e genotoxicidade de *Hibiscus sabdariffa* L. in natura e industrializado, e comparação da toxicidade entre as formas analisadas da planta. **Multítemas**. v. 23, n. 55, 2018.
- MARQUES, P. A. et al. Prescrição farmacêutica de medicamentos fitoterápicos. **Brazillian Journal of Natural Sciences**. v.1, n. 2, 2019.
- MATIAS, E. F. F. et al. Atividade antibacteriana In vitro de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 8, n. 3, 2010.

MATOS, F. J. A. Introdução à fitoquímica experimental. 3ª ed. **Fortaleza: editora da UFC**, 2009.

MENDONÇA, V. M. et al. Fitoterapia tradicional e práticas integrativas e complementares no sistema de saúde do Brasil. **Temas em saúde**. v. 18, n. 1, 2018.

MENEZES, I. O. **Estudo do potencial antibacteriano e modulador dos extratos metanólico e hexânico das entrecascas de luehea paniculata. mart. & zucc. (malvaceae)**. Artigo (Graduação em Farmácia) Faculdade de Juazeiro do Norte. 2018.

NAZZARO, F. et al. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**. v. 6, n. 12, 2013.

ROCKENBACH, A. P. et al. Interferência entre plantas daninhas e a cultura: alterações no metabolismo secundário. **Revista Brasileira de Herbicidas**. v. 17, n. 1, 2018.

RODRIGUES, F. F. G. et al. Study of the interference between *Plectranthus* species essential oils from Brazil and aminoglycosides. **Evidence-based complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, 2013.

ROSA, E. D. S. **Características nutricionais e fitoquímicas em diferentes preparações e apresentações de Hibiscus sabdariffa L. (hibisco, vinagreira, rosela, quiabo-de-angola, caruru-da-guiné) - Malvaceae**. 2013. Monografia (Graduação em Nutrição). Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 2013.

SALEM, M. Z. M; ZOLIVARES-PEREZ, J. SALEM, A. Z. M. Studies on biological activities and phytochemical composition of *Hibiscus* species- A review. **Life Science Journal**. v. 11, n. 5, 2014.

SEKAR, M. et al. Antibacterial Activity of the Methanolic Extract of *Hibiscus sabdariffa* Leaves and Fruits. **British Microbiology Research Journal**. v. 10, n. 5, 2015.

SIMÕES, C. M. O. et al. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da UFRGS. **Florianópolis: Editora da UFSC**. p. 1104, 2010.

SILVEIRA, P. F. DA; BANDEIRA, M. A. M; ARRAIS, P. S. D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.4, 2008.

WEMEDO, S. A. et al. Evaluation of Antibacterial Activity of Zobo and Bay Leaf Extracts on Enteropathogenic Bacteria. **Journal of Advances in Microbiology**. v. 16, n. 2, 2019.