

**UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC**

**CURSO DE FARMÁCIA**

**PAULA DA SILVA CARDOSO**

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E ANTIBACTERIANA DA PLANTA**

***Hibiscus acetosella* WeLw ex Hiern**

**CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2011**

**PAULA DA SILVACARDOSO**

**ANÁLISE FITOQUÍMICA E ANTIBACTERIANA DA PLANTA**

***Hibiscus acetosella* WeLw ex Hiern**

Trabalho de conclusão de curso, apresentado para o curso  
de Farmácia da Universidade do Extremo Sul Catarinense,  
UNESC.

**Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Patrícia de Aguiar Amaral**

**Co-Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Tatiana Barichello**

**CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2011**

# ANÁLISE FITOQUÍMICA E ANTIBACTERIANA DA PLANTA *Hibiscus acetosella* WeLw ex Hiern

<sup>1,2</sup>Paula da S. Cardoso, <sup>2,3</sup>Vanilde C. Zanette, <sup>4</sup>Tatiana Barichello, <sup>2,3</sup>Patricia A. Amaral

<sup>1</sup>Acadêmico do Curso de Farmácia/UNASAU/UNESC. <sup>2</sup>Grupo de Extensão e Pesquisa em Plantas Medicinais/UNAHCE/UNESC - <sup>3</sup>Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais (PPGCA)/UNAHCE/UNESC. <sup>4</sup>Laboratório de Microbiologia Experimental – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (PPGCS)/UNASAU/UNESC.

## RESUMO: “Análise fitoquímica e antibacteriana da planta *Hibiscus acetosella* WeLw ex Hiern”

As espécies de *Hibiscus* pertencente à família *Malvaceae* são amplamente utilizadas na área ornamental, mas nos últimos anos vem ganhando espaço na área alimentícia com suas flores comestíveis e corantes naturais. Alguns estudos demonstram o potencial antibacteriano desta espécie frente a diversos microorganismos. A planta *Hibiscus acetosella* também conhecida popularmente como vinagreira possui poucas informações sobre sua composição química e ação microbiológica. Este estudo teve por objetivo analisar o perfil cromatográfico, quantificar substâncias fenólicas e avaliar ação antibacteriana frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, das folhas de *H. acetosella*. O doseamento dos compostos fenólicos demonstrou que a planta possui aproximadamente 0,359 mg/mL de polifenóis totais e 0,104 mg/ mL de flavonóides nas folhas, as frações com caráter mais polares foram as que tiveram maior concentração de polifenóis totais e flavonóides. As frações butanólico e de acetato de etila mostraram efeito relevante contra os microorganismos *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Esta ação antibacteriana pode estar relacionada com os compostos fenólicos presentes na planta.

Palavras chave: Compostos fenólicos, atividade antibacteriana, *Hibiscus acetosella*

## ABSTRACT: “Phytochemical analysis and antibacterial plant *Hibiscus acetosella* WeLw ex Hiern”

The species of *Hibiscus* belongs to *Malvaceae* family and they are used in ornamental area. Its flowers and natural pigments are being used in nourishing area during the last years and some studies have shown its antibacterial potential. *Hibiscus acetosella* is also popularly known as *vinegar plant* and there is a little information about its chemistry composition as well as its microbiological action. This study has the goal to analyze the chromatographic aspect, to quantify phenol substance and to evaluate its microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* antibacterial potential. The dose of phenol compounds shown the plant has approximately 0,359 mg/mL of total polyphenol and 0,104 mg/ mL of flavones in its leaves. The fractions with more polar character were the ones which more concentration of total polyphenol and flavones. The butanol fraction and ethyl acetate show the relevant effect against *S. aureus* e *P. aeruginosa* microorganisms. The dichloromethanic essence was resistant to three bacteria. That antibacterial action may be related to the phenol compounds in the plant.

Keywords: phenol compounds, antibacterial activity, *Hibiscus acetosella*.

## INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são utilizadas pelo homem há milhares de anos com a finalidade de curar suas enfermidades, o que proporcionou um vasto conhecimento sobre as ações terapêuticas e a toxicidade de determinadas espécies. O conhecimento sobre as plantas medicinais inicialmente era adquirido pela transmissão oral de informações e relatos, hoje além das informações empíricas há também as registradas em herbários e as publicações científicas <sup>1,2</sup>.

Apesar do uso milenar das plantas, apenas um número relativamente pequeno da biodiversidade das espécies presentes no planeta possuem estudos que comprovem sua aplicação terapêutica, eficácia e segurança <sup>3</sup>.

A diversidade molecular dos vegetais está relacionada ao seu metabolismo secundário, sendo este responsável pela produção de compostos químicos necessários para sobrevivência da planta. Os metabólitos secundários se diferenciam em cada espécie para atender uma função ecológica específica. Esta diversidade de moléculas produzidas pelo metabolismo secundário faz com que as plantas sejam uma fonte rica de material de partida para descoberta de moléculas bioativas e desenvolvimento de fármacos <sup>4,5,6,7</sup>.

As plantas medicinais se tornaram fonte riquíssima para descobertas de novos antibacterianos, devido ao alto índice de resistência bacteriana aos fármacos já existentes. Cientistas de todo mundo vêm mostrando o potencial das plantas e de suas substâncias isoladas frente a diversos microorganismos <sup>8,5,9</sup>. Um artigo de revisão listou 75 espécies vegetais com ação antibacteriana, dentro deste estudo constatou-se que dos constituintes químicos presentes nestas plantas os compostos fenólicos foram predominantes e que bactérias gram positivas são sensíveis a este grupo de substâncias <sup>10</sup>.

Dentre a diversidade de plantas o gênero *Hibiscus* pertencente à família *Malvaceae* se destaca na área ornamental com sua diversidade de flores coloridas, mas nos últimos anos

vem ganhado espaço na área alimentícia com suas flores comestíveis e corantes naturais. A maioria das flores desta espécie tem como constituintes as vitaminas A e E, quercetina e antocianinas <sup>11,12,13</sup>.

Em um levantamento de espécies vegetais com ação antibacteriana promissora estavam as plantas *Hibiscus esculentus L.*, *Hibiscus trionum L.* e *Hibiscus syriacus*, onde os extratos aquosos destas demonstraram atividade antibacteriana em ensaios de diluição em caldo contra o microorganismo *Mycobacterium tuberculosis* <sup>14</sup>. Outros gêneros desta espécie como a *Hibiscus sabdariffa* e *Hibiscus tiliacua* já demonstraram ação antibacteriana frente aos microorganismos *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Salmonella choleroesuis* e *Escherichia coli* <sup>15,16</sup>. A *Hibiscus rosa-sinensis* inibiu o crescimento de *S. aureus*, *P. aeruginosas* e foi resistente para *E. coli*, <sup>17</sup> como também o óleo de *Hibiscus cannabinus* foi eficiente para diversas bactérias <sup>18</sup>.

Dentre as espécies do gênero *Hibiscus* temos a *Hibiscus acetosella* de origem africana que é popularmente conhecida como vinagreira, groselheira ou quiabo roxo. Tem como aspectos botânicos ser uma planta arbustiva, de caule semi-lenhoso, folhas cor de vinho escura com nervuras palmadas, e flores solitárias de cor rosa arroxeadas com frutos em cápsulas <sup>19</sup>.

Estudos com a *H. acetosella* relacionados à área agrônoma demonstram a resistência desta planta a larvas, insetos, pragas e nematóides, impedindo a proliferação destes parasitas. <sup>20,21</sup>. Em relação ao perfil químico desta planta já foi constatado a presença de antocianinas em suas flores <sup>22</sup> e em outra avaliação realizada com as folhas foi identificado os constituintes taninos, flavonóides, cumarinas, heterosídeos cardiotônicos e alcalóides. Neste último estudo também foi analisada a ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico 70% das folhas, que apresentou efeito inibitório contra os microorganismos *S. aureus* e *P. aeruginosa* <sup>23</sup>.

Devido à planta *H. acetosella* ter poucas informações na literatura científica em relação aos seus constituintes químicos e ação terapêutica, este estudo tem por objetivo aprofundar os conhecimentos sobre esta planta quanto a sua ação antibacteriana e perfil químico.

## **METODOLOGIA**

### **Preparo do material vegetal**

O material vegetal utilizado para as análises, foram as folhas de *Hibiscus acetosella* colhidas do Horto Florestal da UNESC, identificada pela botânica Dra. Vanilde Citadini Zanette e armazenada sob a forma de exsicata no Herbário Pe. Dr. Raulino Reitz da UNESC, sob o registro 8551. As folhas foram secas em estufa a 40°C e após foram trituradas com auxílio de um moedor de facas para obtenção de um pó fino<sup>24</sup>.

O macerado foi realizado com as folhas em álcool 70% na proporção de 1:5 (p/v), permanecendo por 15 dias em maceração. Após o extrato foi filtrado com papel filtro e posteriormente evaporado o solvente com auxílio de rota evaporador, para a obtenção do extrato hidroalcoólico (70%)<sup>25</sup>.

### **Fracionamento do material vegetal**

A partição líquido-líquido foi realizada com os solventes diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol, após a extração os solventes foram eliminados com auxílio de rota vapor para obtenção das frações<sup>26,27</sup>.

## **Análise fitoquímica**

Foram realizados análises das seguintes classes de substâncias: fenólicas (cumarinas, taninos e flavonóides), alcalóides e heterosídeos cardiotônicos das frações da partição líquido-líquido<sup>28, 29</sup>. Não foram analisadas a presença de antraquinonas e saponinas nas frações, pois no extrato hidroalcoólico as reações foram negativas<sup>23</sup>.

A Cromatografia em coluna (CC) foi realizada em sílica gel 60F tendo como fase móvel os solventes: hexano e acetato de etila nas proporções 8:2, 1:1, 2:8, acetato de etila e metanol 6:4 e metanol<sup>27,30</sup>.

A análise em cromatografia em camada delgada (CCD) foi realizada com as frações da extração líquido-líquido e com as frações da cromatografia em coluna comparando com o padrão quercetina. Os eluentes utilizados foram clorofórmio: acetato de etila (60:40), clorofórmio:metanol: ácido acético glacial (47:47:5), acetato de etila: metanol (60:40), acetato de etila: metanol: água (100: 13,5:10) e butanol: ácido acético glacial:água (50:10:20) . As placas cromatográficas foram analisadas em lâmpada de UV no comprimento de onda 365 nm, algumas placas foram reveladas com revelador anisaldeído<sup>30,31</sup>.

A determinação dos níveis de polifenóis totais foi realizada através do método Folin Ciocalteu, onde a curva padrão foi produzida com soluções de ácido gálico nas concentrações de 250, 200, 150, 100 e 50 mg/L e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 765 nm. Foram analisados o extrato hidroalcoólico (70%), a fração diclorometânica, a fração de acetato de etila e a fração butanólica<sup>32</sup>.

Através do método colorimétrico de Cloreto de Alumínio foi realizado o doseamento dos flavonóides, a curva padrão foi realizada com soluções de quercetina nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL e as leituras foram realizadas em espectrofotômetro a 415

nm. As amostras analisadas foram o extrato hidroalcoólico (70%), fração diclorometânica, fração de acetato de etila e fração butanólica<sup>33</sup>.

### **Avaliação microbiológica**

Avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada através do método do poço, conforme padronizado pela *National Committee for Clinical Laboratory Standards*<sup>33</sup>. As bactérias *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foram inoculadas em ágar Mueller Hinton, Cetrimide e MacConkey, respectivamente. A cultura bacteriana foi crescida a 37 °C por 24 horas. Após a incubação, a cultura foi diluída em solução salina estéril (NaCl 0,9%) de acordo com a escala de MacFarland 0,5, a fim de se obter uma densidade bacteriana de aproximadamente 10<sup>8</sup> UFC/mL. Uma alíquota da suspensão foi inoculada em placa contendo ágar Mueller Hinton, mergulhando-se um *swab* estéril sobre a suspensão. A alíquota microbiana foi espalhada de forma homogênea por toda a placa. Foram realizados em cada placa um poço com 7 mm de diâmetro e inoculado 60 µL da amostra (fração diclorometânica, fração de acetato de etila e fração butanólica), também foi colocado um disco contendo o antibiótico ceftriaxona como controle positivo e 60 µL solução utilizada para ressuspender as amostras como controle negativo (água com 3% de *tween* 80). A placa foi incubada a 37 °C por 24 horas. Após a incubação foi verificado a presença de halo de inibição ao redor do material e mensurado seu diâmetro com auxílio de uma régua milimetrada<sup>34</sup>.



## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A extração das folhas de *H. acetosella*, através da técnica de maceração teve rendimento de 12,2% de extrato hidroalcoólico (70%). A partição do extrato hidroalcoólico demonstrou que os solventes, acetato de etila e butanol tiveram maior rendimento em relação ao diclorometano, conforme tabela 1.

**Tabela 1:** Rendimento do fracionamento líquido-líquido realizado com 8g de extrato mole hidroalcoólico

Frações	Rendimento
Acetato de etila	1,612 g
Butanol	0,997 g
Diclorometano	0,362 g

As análises farmacognósticas das frações mostraram que a fração diclorometânica se diferencia das demais quanto à composição fitoquímica (Tabela 2).

**Tabela 2:** Reações indicativas de substâncias presentes nas frações de butanol (BuOH), acetato de etila (AcEt) e diclorometano (DiCl)

	BuOH	AcEt	DiCl	Reações
Substâncias Fenólicas	+	+	+	Cloreto férrico; Hidróxido de potássio
Flavonóides	+	+	+	Óxido de magnésio; Ácido clorídrico
Taninos	+	+	-	Cloreto férrico; Solução de gelatina
Cumarinas	+	+	+	Reativo de KOH; Visualização UV
Alcalóide	-	-	-	Reativo de Mayer
	+	+	+	Reativo de Dragendorff

	+	-	+	Reativo de Brouhardat;
	-	-	-	Reativo de Bertrand
Heterosídeos cardiotônicos	+	+	-	Reação de Baljet;
	+	+	-	Reação de Keller-Kiliani;

---

Legenda: (+) resultado positivo para reação; (-) resultado negativo para reação

### **Análises cromatográficas**

O perfil cromatográfico das três frações de partição líquido-líquido se diferenciou tanto na coloração como no fator de retenção (fr) das bandas, no entanto, nenhuma das frações apresentou bandas com mesmo perfil que as produzidas pelo padrão de quercetina. De todos os eluentes utilizados o butanol: ácido acético glacial: água (50:10:20) foi o mais eficiente para obtenção do melhor perfil cromatográfico. As placas reveladas com anisaldeído apresentaram na fração butanólica várias bandas de coloração avermelhada, conforme Bladt, 1996<sup>34</sup> o surgimento desta coloração caracteriza a presença de antocianidinas, já fração de acetato de etila apresentou somente uma macha avermelhada.

A fração diclorometânica demonstrou duas bandas de coloração alaranjada, característico de flavonóides. Quando utilizado o solvente clorofórmio: metanol: ácido acético glacial para identificação de alcalóides além das bandas alaranjadas, também surgiram bandas de coloração amarela, rosa e azul, sendo que a cor azul é indicativa de alcalóides. A fração de acetato de etila apresentou bandas de coloração amarela, alaranjada, verde e azul clara, caracterizando a presença de flavonóides e alcalóides. A fração butanólica demonstrou bandas de coloração azul clara e verde escura, caracterizando a presença de flavonóide e alcalóides.

A cromatografia em coluna produziu 26 frações avaliadas por cromatografia em camada delgada, onde aquelas com perfil cromatográfico semelhantes foram reagrupadas

dando um total de 6 frações nomeadas de A,B,C,D,E e F. A fração A apresentou apenas uma banda no superior da placa de coloração azul clara demonstrando que pode ser uma substância isolada. Já as demais frações demonstraram colorações azuis, verde, amarelo e alaranjado.

### Doseamento de compostos fenólicos

As equações de reta foram obtidas a partir da regressão linear utilizando o programa Microsoft Excel®. A curva padrão com ácido gálico gerou a equação da reta  $y = 0,001x + 0,014$ , com coeficiente de correlação (r) de 0,997. A curva padrão de quercetina para doseamento de flavonóides gerou a equação de reta  $y = 0,007x - 0,002$ , com coeficiente de correlação (r) de 0,997. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados estão descritos em mg/mL (tabela 3).

O extrato hidroalcoólico de *H. acetosella* apresentou aproximadamente 0,359 mg/mL de polifenóis totais e 0,104 mg/ mL de flavonóides. Plantas como a *Matricaria recutita* apresentam de 0,5 a 3% de flavonóides e *Calendula officinalis* 0,3 a 0,6 %<sup>34</sup>. A determinação da concentração dos compostos fenólicos pode sofrer alterações devido ao cultivo, armazenamento, metodologia de extração e análise<sup>35</sup>.

**Tabela 3:** Concentração de polifenóis totais e flavonóides em mg/mL

Frações	Concentração Polifenóis totais	Concentração Flavonoides
Acetato de etila	0,293 mg/mL	0,107 mg/mL
Butanol	0,331 mg/mL	0,100 mg/mL
Diclorometano	0,325 mg/mL	0,102 mg/ mL
Hidroalcoólico	0,359 mg/mL	0,104 mg/ mL

Os compostos fenólicos são produzidos pelo metabolismo secundário com a finalidade de defesa a insetos, patógenos e demais inimigos ambientais. Os níveis elevados destas substâncias na planta influenciam no aumentam a resistência a patógenos e insetos <sup>36</sup>. Como também há vários estudos que apresentaram possíveis ações carcinogênicas e genotóxicas de compostos fenólicos quando administrados em elevadas concentrações <sup>35</sup>.

Os compostos fenólicos são conhecidos por possuir atividade antiinflamatória <sup>37</sup>, efeito hipolipemiante <sup>38</sup> e principalmente pelas suas propriedades antioxidantes <sup>39,40,41</sup>. Sendo que a ação antioxidante esta relacionada com sua atividade antibacteriana <sup>42</sup>.

### **Análise microbiológica**

O antibiograma realizado com as frações butanólica e de acetato de etila demonstram ação antibacteriana relevante frente aos microorganismos *S. aureus* e *P. aeruginosa*, já a fração diclorometânica foi resistente a todas as bactérias. O diâmetro em milímetros (mm) dos halos de inibição estão descritos na tabela 4.

Para diluição das amostras foi utilizado água com *tween* 80 a 3%, sendo esta a melhor concentração utilizada para diluir as amostras sem interferir nos resultados, esta solução foi utilizado como controle negativo e os testes foram realizados em duplicata.

**Tabela 4:** Diâmetros dos halos de inibição em mm das frações provindas do fracionamento líquido-líquido da *Hibiscus acetosella*

<b>Amostras</b>	<b>Concentração</b>	<b><i>E. coli</i></b>	<b><i>S. aureus</i></b>	<b><i>P. aeruginosa</i></b>
Padrão (+)	30 mg	30 mm	24 mm	17 mm
Padrão (-)	60 µL	0 mm	0 mm	0 mm
Acetato de etila	25 mg	5 mm	24 mm	11 mm

Butanol	25 mg	0 mm	19 mm	12 mm
Diclorometano	25 mg	0 mm	0 mm	0 mm

---

Legenda: Padrão (+) : Ceftriaxona 30mg ; Padrão (-) : Água e tween 80 a 3%

As frações butanólica e de acetato de etila testadas na concentração de aproximadamente 25 mg demonstraram ação antibacteriana relativamente semelhantes aos resultados do estudo de Mandelli <sup>23</sup>, realizado com 60 mg do extrato hidroalcoólico frente as bactérias *S aureus* e *P.aeruginosas*, que tiveram halo de inibição de 21 mm e 19 mm respectivamente. Em relação a *E. coli* onde o extrato hidroalcoólico teve 16 mm de halo de inibição, as frações não foram eficientes, pois apenas a fração de acetato de etila impediu o crescimento bacteriano em um diâmetro de 5 mm.

A técnica de difusão em ágar não é a mais adequada para extratos apolares, o que pode justificar a resistência bacteriana frente à fração diclorometânica, já que este extrato possui um caráter apolar. Em relação ao perfil fitoquímico, esta fração não possui taninos e heterosídeos cardiotônicos como os demais extratos que demonstraram atividade, portanto a ausência destes componentes pode também justificar sua ineficácia <sup>10</sup>.

Dentre estes metabólitos secundários os polifenóis se destacam em relação à atividade antibacteriana, pois este grupo de moléculas é sintetizado pelas plantas para proteção contra patógenos, sendo as moléculas mais relevantes os flavonóides e os taninos <sup>43,44, 45,46</sup>.

Há vários estudos que demonstram o potencial antibacteriano dos extratos com alto teor de polifenóis ou isolados, porém seu mecanismo de ação ainda não está bem esclarecido. Alguns autores têm sugerido que sua ação esta relacionada com inibição de proteínas, enzimas e interação com elementos da membrana alterando sua permeabilidade e fluidez <sup>10, 44, 45, 47, 48, 49</sup>. Outra hipótese é que a privação de ferro inibe o crescimento das bactérias, devido à excelente ação quelante dos polifenóis <sup>44</sup>.

Os flavonóides possuem grande atividade sobre as bactérias gram positivas, pois são capazes de penetrar a membrana fosfolipídica e exercer função dentro da bactéria <sup>46</sup>. Estudo constatou que os polifenóis danificam e aumentam a permeabilidade da membrana interna e externa da *P. aeruginosa* <sup>50</sup>.

Análise quantitativa de polifenóis de plantas utilizadas popularmente demonstrou que as plantas com maior concentração de taninos eram aquelas utilizadas com ação antibacteriana <sup>16</sup>. Alguns estudos já comprovaram a ação inibitória dos taninos a enzimas microbianas como as pectinases, celulase e glicosil transferase <sup>51</sup>.

Outros metabolitos secundários como os alcalóides <sup>52, 53</sup> e as cumarinas <sup>54, 55</sup> também possuem estudos que relatam sua ação frente a bactérias gram positivas e gram negativas, como também não podemos descartar a possibilidade do sinergismo entre as moléculas <sup>56, 57</sup>.

A resistência bacteriana é um problema de saúde pública <sup>58</sup> e por isto é de extrema importância a busca de novas fontes terapêuticas, como também novos conservantes para área alimentícia e cosmética.

## CONCLUSÃO

A planta *H. acetosella* é uma fonte interessante de polifenóis tendo aproximadamente 1% de flavonóides e 6% de polifenóis totais, sendo que estes podem estar relacionados com ação antibacteriana da planta. As frações butanólica e de acetato de etila, tiveram maior concentração de polifenóis totais e flavonóides, como também foram as frações com maior atividade antibacteriana frente às bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa*. A fração de acetato de etila na concentração de 25 mg demonstrou ação idêntica a ceftriaxona para o microorganismo *S. aureus* com halo de inibição de 24mm para ambas. Os resultados

demonstraram melhor ação dos extratos frente à bactéria gram positiva do que em relação às gram negativas.

No entanto outros ensaios fitoquímicos devem ser realizados com a finalidade de quantificar e elucidar os compostos químicos presentes nesta planta, como também outras análises microbiológicas.

## REFERÊNCIA

1. Veiga-Junior VF, Pinto AC. Plantas medicinais: cura segura? *Quim. Nova* 2005; 28 (3): 519-528.
2. Balunas MJ, Kinghorn A. Douglas. Drug discovery from medicinal plants. *Life Sci* 2005; 78:431 – 441.
3. Organización Mundial de la Salud. Situación reglamentaria de los medicamentos herbários: una reseña mundial. *OMS* Ginebra 2000. WHO/TRM/98.1.
4. Iwu M. Ethnobotanical approach to pharmaceutical drug discovery" strengths and limitations. *Ethnomedicine and Drug Discovery* 2002.
5. Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon* 2001; 39: 603–613.
6. Gurib-Fakim A. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. *Mol Aspects Med* 2006; 27:1–93.
7. Halberstein RA.. Medicinal Plants: Historical and Cross-Cultural Usage Patterns. *Ann Epidemiol* 2005; 15 (9): 686–699.
8. Khullar N. Antimicrobials from plants and their use in therapeutics and drug discovery. *The IIOAB Journal* 2010; 1 (3): 31-37.
9. Rauha J, Remesa S, Heinonenb M, Hopiab A, Kauhkounenb M, Pihlajac TK, Vuorela H., Vuorela P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol* 2000; 56: 3–12
10. Ríos JL, Recio MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharmacol* 2005; 100: 80–84.
11. Bovini MG, Carvalho-Okano RM, Vieira MF. Malvaceae A. Juss. no Parque Estadual do Rio Doce, Minas Gerais, Brasil. *Rodriguésia* 2001; 52(81):17-47.
12. Leal RS. Estudo etnofarmacológico e fitoquímico das espécies *Cleome spinosa* Jacq, *Pavonia varians* Moric e *Croton cajucara* Benth. **Tese (doutorado)** - Universidade

Federal do Rio Grande do Norte. Centro de ciências exatas e da terra. Programa de pós graduação em química. 2008.

13. Puckhaber, L., R.D. Stipanovic, and G.A. Bost. 2002. Analyses for flavanoid aglycones in fresh and preserved hibiscus flowers. p. 556–563. In: J. Janick and A. Whipkey (eds.), *Trends in new crops and new uses*. ASHS Press, Alexandria, VA.
14. Gautam R, Saklani A, Jachak M. Indian medicinal plants as a source of antimycobacterial agents. *J Ethnopharmacol* 2007; 110: 200–234.
15. Wong SK, Lim YY, Chan EWC. Evaluation of Antioxidant, Anti-tyrosinase and Antibacterial Activities of Selected Hibiscus Species. *Ethno Leaflets* 2010; 14: 781-96.
16. Siqueira CFQ, Cabral DLV, Sobrinho TJSP, Amorim ELC, Melo JG, Araújo TAS, Albuquerque UP. Levels of Tannins and Flavonoids in Medicinal Plants: Evaluating Bioprospecting Strategies. *J Evid Based Complementary Altern Med* 2006; 7.
17. Seyyednejad SM, Koochak H, Darabpour E, Motamedi H. A survey on Hibiscus rosasinesis, Alcea rosea L. and Malva neglect wallr as antibacterial agents. *Asian Pac J Trop Med* 2010; 351-355.
18. Maganha EG, Halmenschlager RC, Rosa RM, Henriques JAP., Ramos ALLP, Saffi J MP. pharmacological evidences for the extracts and secondary metabolites from plants of the genus Hibiscus. *Food Chem* 2010; 118:1–10.
19. Lorenzi H, SOUZA HM. *Plantas ornamentais no Brasil :arbustivas, herbáceas e trepadeiras*. 2.ed Nova Odessa, SP: Plantarum, 1999. 1088 p.(716)
20. Sakhanokho HF. *In Vitro* Multiple Shoot Induction and Plant Regeneration from Shoot Apices of *Hibiscus acetosella* Weiw. ex. Hiern. *J Crop Improvement* 2008; 21(2).
21. Boyd DW, Cheatham CL.. Evaluation of twelve genotypes of *hibiscus* for resistance to *hibiscus* sawfly, *Atornacera decepta* Rohwer (Hymenoptera: Argidae). *J Environ Hort* 22:170-172.2. 2004.
22. Março PH. *Estudo da influência da radiação e pH no comportamento cinético de antocianinas de plantas do gênero Hibiscus por métodos quiométricos* [Tese]. São Paulo (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2009.
23. Mandelli FD. *Análise farmacognóstica e avaliação da atividade antimicrobiana de Hibiscus acetosella* [Trabalho de Conclusão de Curso]. Santa Catarina (SC): Universidade do Extremo Sul Catarinense; 2010.
24. **Farmacopéia brasileira**. 2.ed. São Paulo: Siqueira; 2002.
25. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário Nacional / Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. – Brasília : **MS**, 2005. 174 p.



26. Cechinel-filho V, Yunes RA. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Quim Nova* 1998; 21(1): 99-105, Fevereiro 1998.
27. Carvalho JCT, Gosmann G, Schenkel EP. Compostos fenólicos simples e heterosídicos. In: Simões, CMO. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5.ed. rev. ampl. Porto Alegre: UFRGS; 2003. 1102 p.
28. Costa AF. *Farmacognosia*. 2ª ed. Lisboa: Fundação Colouste Gulbenkian; 1972. v.3 p.1032
29. Xorge AD. *Métodos de Investigação Fitoquímica*. México, Editorial Limusa ; 1973 p.281
30. Collins CH, Braga GL., Bonato PS. *Introdução a métodos cromatográficos*. 7 ed. Campinas: UNICAMP, 1997. p.279
31. Bladt WH, *Plant drug analysis – a thin-layer chromatography atlas*. 2 ed. Berlin, Springer, 1996.
32. Shahidi F, Naczki M. Food phenolics: Sources, Chemistry, Effects, Applications, Technomic. *Publishing Company Inc*. 1995.
33. Chang C, Yang M, Wen H, Chern J. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *J Food Drug Analysis* 2002; 10: 178-182.
34. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests. Approved Standard—Tenth Edition. CLSI document M02-A10. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.
35. Balasundram N, Sundram K, Samman S. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem* 2006; 99:191–203.
36. Lattanzio V, Lattanzio VMT, Cardinali A. Role of phenolics in the resistance mechanisms of plants against fungal pathogens and insects. *Phytochemistry* 2006; 23-67.
37. Sergent T, Neil P, Meurice J, Toussaint O, Schneider YJ. Anti-inflammatory effects of dietary phenolic compounds in an *in vitro* model of inflamed human intestinal epithelium. *Chem Biol Interact* 2010; *in press*
38. Yang MY, Peng CH, Chan KC, Yang YS, Huang CN, Wang CJ. The hypolipidemic effect of Hibiscus sabdariffa polyphenols via inhibiting lipogenesis and promoting hepatic lipid clearance. *J Agric Food Chem* 2010; 58(2):850-9.

39. Frankel PT, Alemão JB, Kinsella JEE, Parques ESCB, Kanner J. Inhibition of oxidation of human low-density lipoprotein by phenolic substances in red wine. *The Lancet* 1993; 341:454-7.
40. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 1997; 2 (4)
41. Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 1996; 20 (7): 933-956.
42. Urs NVMM, Dunleavy JM. Enhancement of the bactericidal activity of a peroxidase system by phenolic compounds. *Phytopathology* 1975; 65:689:690.
43. Hevsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther* 2002; 96:67– 202.
44. Mila I, Scalbert A, Expert D. Iron withholding by plant polyphenols and resistance to pathogens and rots. *Phytochemistry* 1996; 42 (6): 1551-1555.
45. Cowan MM. Plant Products as Antimicrobial Agents. *Clin Microbiol Rev* 1999; 12 (4): 564–582.
46. Daglia M. Polyphenols as antimicrobial agents. *Curr Opin Biotechnol* 2011; 23:1-8.
47. Rauha J, Remesa S, Heinonen M, Hopia A, Kauhkonen M, Pihlajac TK, Vuorela H, Vuorela P. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int J Food Microbiol* 2000; 56: 3–12.
48. Cushnie TPT, Lamb AJ. Review Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 2005; 26: 343–356.
49. Petti S, Scully C. Polyphenols, oral health and disease: A review. *J dentistry* 2003; 37: 413-423.
50. Shu-min Y, Jun-li Z, Ling-lin F, Jian-rong L. Tea polyphenols inhibit *Pseudomonas aeruginosa* through damage to the cell membrane. *Int J Food Microbiol* 2010; 144:111–117.
51. Chung K, Wei C, Johnsonx MG. Are tannins a double-edged sword in biology and health. *Trends Food Sci Technol* 1998; 9: 168-175.
52. Morel AF, Maldaner G, Ilha V, Missau F, Silva UF, Dalcol II. Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss and their antimicrobial activity. *Phytochemistry* 2005; 66: 2571–2576.
53. Morel AF, Araujosa CA, Silva UF, Hoelzela SCSM, Zachiab R. Bastosb N. R. Antibacterial cyclopeptide alkaloids from the bark of *Condalia buxifolia*. *Phytochemistry* 2002; 61: 561–566.

54. Ojala T, Remes S, Haansuu P, Vuorela H, Hiltunen R, Haahtela K, Vuorela P. Short communication Antimicrobial activity of some coumarin containing herbal plants growing in Finland. *J Ethnopharmacol* 2000; 299–305.
55. Kwon Y, Kobayashi A, Kajiyama S, Kawazu K, Kanzaki H, Kim C. Antimicrobial constituents of angelica dahurica roots. *Phytochemistry* 1997; 44 (5): 88-889, 1997.
56. Stermitz FR, Lorenz P, Tawara JN, Zenewicz LA, Lewis K. Synergy in a medicinal plant: Antimicrobial action of berberine potentiated by 5\*-methoxyhydnocarpin, a multidrug pump inhibitor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(4):1433-37.
57. Chang ST, Chen PF, Chang SC. Antibacterial activity of leaf essential oils and their constituents from *Cinnamomum osmophloeum*. *J Ethnopharmacol* 2001; 77(1):123-7.
58. World Health Organization. Antimicrobial resistance:a global threat. *Essent Drugs* 2000; 28-29.

