



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DA BAHIA
CENTRO DAS CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA

MARLENE SANTOS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA FITOQUÍMICA, CITOTOXICIDADE E DAS ATIVIDADES ANTI-
INFLAMATÓRIA E ANTIBACTERIANA DO *Hibiscus Sabdariffa* L. CONTRA
Staphylococcus aureus RESISTENTE A MÚLTIPLOS FÁRMACOS.**

Barreiras – BA

2021

MARLENE SANTOS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA FITOQUÍMICA, CITOTOXICIDADE E DAS ATIVIDADES ANTI-
INFLAMATÓRIA E ANTIBACTERIANA DO *Hibiscus Sabdariffa* L. CONTRA
Staphylococcus aureus RESISTENTE A MÚLTIPLOS FÁRMACOS.**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Universidade Federal do Oeste da Bahia, como
requisito parcial para obtenção do Diploma de
Graduação no Curso de Farmácia.

Orientadora: Prof. Dr.^a Katyúscya Veloso Leão.

Coorientadora: Prof. Dr.^a Cláudia Vieira Prudêncio.

Barreiras – BA

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

S586

Silva, Marlene Santos da

Avaliação da fitoquímica, citotoxicidade e das atividades anti-inflamatória e antibacteriana do *Hibiscus sabdariffa* L. contra *Staphylococcus aureus* resistente a múltiplos fármacos. / Marlene Santos da Silva. – 2021.

65f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Katyúscya Veloso Leão

TCC - Graduação em Farmácia, Universidade Federal do Oeste da Bahia. Centro das Ciências Biológicas e da Saúde - Barreiras, BA, 2021.

1. Fitoterapia – Medicina Natural. 2. Físico-Química. I. Leão, Katyúscya Veloso. II. Universidade Federal do Oeste da Bahia – Centro das Ciências Biológicas e da Saúde III. Título.

CDD 615.535

Biblioteca Universitária de Barreiras – UFOB

MARLENE SANTOS DA SILVA

AVALIAÇÃO DA FITOQUÍMICA, CITOTOXICIDADE E DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIBACTERIANA DO *Hibiscus Sabdariffa* L. CONTRA *Staphylococcus aureus* RESISTENTE A MÚLTIPLOS FÁRMACOS.

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Universidade Federal do Oeste da Bahia, como requisito parcial para obtenção do Diploma de Graduação no Curso de Farmácia.

Aprovado em 19 de maio de 2021.

BANCA EXAMINADORA:

Documento assinado digitalmente
 Katyuscia Veloso Leao
Data: 21/05/2021 21:53:13-0300
CPF: 053.224.156-88

Prof.^(a)Dr^aKatyúscya Veloso Leão
Orientadora

Documento assinado digitalmente
 Marina Meirelles Paes
Data: 19/05/2021 20:54:53-0300
CPF: 115.767.147-05

Prof.^(a)Dr^a Marina Meirelles Paes
(Membro)

Documento assinado digitalmente
 Jamille Souza Fernandes
Data: 19/05/2021 21:03:44-0300
CPF: 841.438.865-53

Prof.^(a)Dr^a Jamille Souza Fernandes
(Membro)

Dedico este trabalho a minha mãe, Sra. Jucélia Jesus Carneiro dos Santos, que sempre esteve ao meu lado e me apoiou em todos os momentos, sem ela nada seria possível.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por me dar força e coragem para superar os desafios desta longa jornada;

À minha mãe Sra. Jucélia J. C. dos Santos, pelo apoio, confiança e orgulho por cada conquista realizada;

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Katyúscya Veloso Leão pela confiança, amizade, orientação inigualável e por todo conhecimento que me passou durante minha vida acadêmica;

À minha coorientadora Prof.^a Dr.^a Cláudia Vieira Prudêncio pelo auxílio no desenvolvimento desta pesquisa, nos ensaios de atividade antibacteriana e por todo tempo dedicado à minha coorientação;

Ao Prof. Dr. Jonatas Gomes da Silva pela amizade, paciência e apoio na avaliação estatística dos resultados desta pesquisa;

Ao Prof. Dr. Jonilson Berlink Lima pelo apoio na realização dos ensaios de atividade anti-inflamatória e citotóxica;

À Prof.^a Dr.^a Marina Meirelles Paes pelo auxílio no desenvolvimento dos testes fitoquímicos qualitativos;

Ao Prof. Dr. Gustavo Roberto Villas Boas por doar o material vegetal;

À todos os professores do curso de Farmácia da Universidade Federal do Oeste da Bahia pelo ensino de qualidade, dedicação e cuidado excepcional na transmissão conhecimento aos discentes;

Aos colegas de turma, em especial Patrícia da Silva Vinhático, Isaac Santiago Cedraz e Vinícius Dourado de Brito pelo incentivo, amizade inestimável e por todos os momentos compartilhados ao longo do curso;

Aos colegas do laboratório 111 por proporcionarem a existência de um ambiente acolhedor, pela ajuda sempre que necessário, amizade e momentos vividos;

Ao Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz-Salvador/BA), onde foram realizados os ensaios de atividade anti-inflamatória e citotoxicidade;

À Universidade Federal do Oeste da Bahia pela oportunidade;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela bolsa e financiamento desta pesquisa.

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano”

Isaac Newton

RESUMO

O emprego de plantas medicinais no tratamento de diversas patologias é uma prática milenar, dentre as quais, a espécie *Hibiscus sabdariffa* L., utilizada popularmente para tratar diferentes problemas de saúde, como hipertensão, dislipidemias, transtornos gastrointestinais e infecções hepáticas, tem sido tema de numerosos estudos. Contudo algumas ações como a atividade anti-inflamatória e antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* multirresistente, além de sua citotoxicidade, permanecem pouco esclarecidas. Tendo isso em vista, este trabalho teve como objetivo avaliar tais ações em conjunto com o perfil fitoquímico do extrato etanólico e frações (metanólica e acetato de etila) do *H. sabdariffa* L.. No primeiro momento foi realizada a análise fitoquímica qualitativa, quantificação dos fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu, quantificação de flavonóides pela metodologia descrita por Oppermann et al. (2017) e avaliação da atividade antioxidante pelo método de captura do radical DPPH e o de captura do radical ABTS, em seguida a atividade antibacteriana foi verificada pelo ensaio de difusão em ágar, a atividade anti-inflamatória por meio da quantificação de óxido nítrico produzido por macrófagos estimulados e a citotoxicidade pelo método de redução do XXT. A partir destes ensaios, pode-se observar resultados promissores quando comparado aos apresentados na literatura, encontrou-se uma concentração de fenóis totais e flavonoides elevada especialmente na fração metanólica (44,7 mg EqAG/g e 4,31 mg EqQ/g respectivamente), com uma CE₅₀ para a atividade antioxidante de 88,81 µg/mL (DPPH) e 60,04 µg/mL (ABTS). O ensaio realizado para avaliação da atividade antibacteriana demonstrou que o extrato etanólico do *H. sabdariffa* foi capaz de levar a formação de halos de inibição dose-dependente. A avaliação da atividade anti-inflamatória não demonstrou resultados satisfatórios, visto que a coloração dos extratos possivelmente interferiu nos resultados e, na avaliação citotóxica o extrato e frações exibiram toxicidade nas concentrações utilizadas, levando a morte das células. Tais resultados demonstram que a utilização do extrato do *H. sabdariffa* para fins antibacterianos contra *S.aureus* resistente a múltiplos fármacos pode ser aplicada para elaboração de produtos sanitizantes ambientais, por ter demonstrado citotoxicidade em concentrações inferiores às testadas no ensaio de atividade antibacteriana.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Hibiscus. Bioatividade. Polifenóis.

ABSTRACT

The use of medicinal plants in the treatment of various pathologies is an ancient practice, among which, the species *Hibiscus sabdariffa* L., popularly used to treat different health problems, such as hypertension, dyslipidemias, gastrointestinal disorders and liver infections, has been the subject of numerous studies. However some actions such as anti-inflammatory and antibacterial activity against multidrug-resistant *Staphylococcus aureus*, besides its cytotoxicity, remain poorly understood. With this in mind, this work aimed to evaluate these actions together with the phytochemical profile of the ethanolic extract and fractions (methanolic and ethyl acetate) of *H. sabdariffa* L.. At first, qualitative phytochemical analysis was performed, quantification of total phenols by the Folin-Ciocalteu method, quantification of flavonoids by the methodology described by Oppermann et al. (2017) and evaluation of antioxidant activity by the DPPH radical capture method and the ABTS radical capture method, then the antibacterial activity was verified by the agar diffusion assay, the anti-inflammatory activity by quantification of nitric oxide produced by stimulated macrophages and cytotoxicity by the XXT reduction method. From these assays, promising results can be observed when compared to those presented in the literature, a high concentration of total phenols and flavonoids was found especially in the methanolic fraction (44.7 mg EqAG/g and 4.31 mg EqQ/g respectively), with a CE50 for antioxidant activity of 88.81 $\mu\text{g/mL}$ (DPPH) and 60.04 $\mu\text{g/mL}$ (ABTS). The assay performed to evaluate the antibacterial activity showed that the ethanolic extract of *H. sabdariffa* was able to lead to the formation of dose-dependent inhibition halos. The evaluation of the anti-inflammatory activity did not show satisfactory results, since the coloration of the extracts possibly interfered in the results and, in the cytotoxic evaluation, the extract and fractions exhibited toxicity in the concentrations used, leading to cell death. These results demonstrate that the use of *H. sabdariffa* extract for antibacterial purposes against multidrug-resistant *S. aureus* can be applied to the elaboration of environmental sanitizing products, for having demonstrated cytotoxicity at concentrations lower than those tested in the antibacterial activity assay.

Key words: Medicinal plants. *Hibiscus*. Bioactivity. Polyphenols.

ISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Atividade Antioxidante
Abs	Absorbância
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
Ác.	Ácido
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BA	Bahia
BHI	Caldo Infusão Cérebro Coração
BOD	Demanda Bioquímica de Oxigênio
CNPJ	Cadastro Nacional da Pessoa Jurídica
COX-2	Ciclo-oxigenases
DHFR	Diidrofolato Redutase
DL₅₀	Dose Letal 50
DMEM	Meio Eagle Modificado de Dulbecco
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EBE	Extrato Bruto Etanólico
CE₅₀	Concentração Efetiva 50
EQ	Equivalente de Quercetina
EqAG	Equivalente de Ácido Gálico
FrAc	Fração Acetato
FrM	Fração Metanólica
<i>H. sabdariffa</i>	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.
IC₅₀	Concentração inibitória 50
IL	Interleucina
iNOS	Óxido Nítrico Síntase
LPS	Lipopolissacarídeo
LTDA	Limitada
MCP-1	Proteína 1 Quimioatrativa de Monócitos
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> Resistente a Meticilina
MTT	(3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-brometo de difeniltetrazólio)

PBP	Proteína de Ligação a Penicilina
PCR	Proteína C Reativa
PG	Prostaglandina
pH	Potencial Hidrogeniônico
QRDR	Regiões Determinantes de Mutações às Quinolonas
rRNA	Ácido Ribonucléico Ribossômico
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
TNF – alfa	Fator de Necrose Tumoral alfa
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV-Vis	Ultravioleta Visível
XXT	2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-
carboxanilida	

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Cálices e flor do *H. sabdariffa* L. pag.22
- Figura 2** – Estrutura química das antocianinas delphinidina-3-sambubiosídeo (à esquerda) e cianidina-3-sambubiosídeo (à direita). pag. 25
- Figura 3** – Concentração de fenóis totais em mg EqAG/g de amostra para o extrato etanólico e frações. pag. 47
- Figura 4** – Concentração de flavonoides em mg EqQ/g de amostra para o extrato etanólico e frações. pag. 47
- Figura 5** – Representação da reação do radical DPPH• com uma espécie antioxidante (AOH), na qual este sofre redução após receber elétrons/hidrogênio. pag. 50
- Figura 6** – Representação do mecanismo de geração do radical ABTS•⁺ a partir do seu precursor, ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico, ao reagir com persulfato de potássio e, subsequente reação do radical formado com a espécie antioxidante (AOH), com redução e estabilização do mesmo após transferência de elétrons/hidrogênio. pag. 51
- Figura 7:** Halos de inibição formados após incubação da cepa 1 (22G), 2 (1SGB) e 3 (11iB) de *S. aureus* com o extrato etanólico de *H. sabdaridda* L. pag. 53
- Figura 8:** Níveis de nitrito formado a partir do óxido nítrico produzido por células RAW 264.7 induzidas por LPS, após serem incubadas com concentrações seriadas do extrato etanólico e frações. Os dados são representados por média ± DP (n=3). pag. 55
- Figura 9:** Porcentagem de viabilidade celular pela redução do XTT, após incubação com o extrato etanólico e frações. Os dados são representados por média ± DP (n=3). pag. 56

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1:** Classificação taxonômica do *H. sabdariffa* L. pag. 21
- Quadro 2:** Constituintes fitoquímicos isolados a partir do extrato aquoso dos cálices de *H. sabdariffa* L. pag. 24
- Quadro 3:** Exemplos de antibióticos e mecanismos de resistência aos quais cepas de *S. aureus* perderam sensibilidade (continua). pag. 29
- Quadro 4:** Volumes utilizados da solução estoque de ácido gálico a 0,1 mg/mL para a construção da curva padrão. pag. 40
- Quadro 5:** Classificação das amostras de *S. aureus* utilizadas nos ensaios de atividade antibacteriana do *H. sabdariffa* L. pag. 42

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus centígrados
mg	Miligrama
mL	Mililitro
>	Maior que
%	Por cento (porcentagem)
Kg	Quilograma
g	Grama
L	Litro
mm	Milímetro
=	Igualdade
nm	Nanômetro
+	Soma
µg	Micrograma
R²	Coeficiente de determinação
µl	Microlitro
µmol	Micromol
-	Subtração
÷	Divisão
X	Multiplicação
mM	Milimolar
mol	Quantidade de matéria
ng	Nanograma
cm	Centímetros
±	Mais ou menos
M	Massa molar
µ	Momento dipolo
r	Coeficiente de correlação
n-1	Graus de liberdade, em que “n” é o tamanho da amostra
P	Nível de significância estatística

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Análise fitoquímica qualitativa do extrato etanólico e frações metanólica e acetato de etila. pag.45

Tabela 2 – CE₅₀ para atividade antioxidante pelos métodos de captura do DPPH e ABTS, com seus respectivos coeficientes de correlação (r). pag. 48

Tabela 3 – Análise da diferença estatística das metodologias empregadas para avaliar a atividade antioxidante. pag. 49

Tabela 4: Atividade antibacteriana do *H. sabdariffa* L. contra *S. aureus*. pag. 52

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
2.1	Plantas medicinais.....	20
2.2	Gênero Hibiscus	20
2.3	A espécie <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	21
2.4	Atividade antioxidante e metabólitos secundários do <i>H. sabdariffa</i> L.	23
2.5	Atividade antibacteriana.....	25
2.6	A espécie <i>Staphylococcus aureus</i>	26
2.7	Atividade anti-Inflamatória.....	32
2.8	Toxicidade do <i>H. sabdariffa</i> L.	33
3	OBJETIVOS	35
3.1	Objetivo geral	35
3.2	Objetivos específicos	35
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	36
4.1	Materiais.....	36
4.2	Métodos.....	36
4.2.1	Obtenção do material vegetal.....	36
4.2.2	Preparo do extrato bruto etanólico	37
4.2.3	Fracionamento do extrato.....	37
4.2.4	Testes fitoquímicos.....	37
4.2.5	Determinação de fenóis totais.....	38
4.2.6	Quantificação de flavonoides	39

4.2.7	<i>Atividade antioxidante: método de captura do radical DPPH[•]</i>	39
4.2.8	<i>Atividade antioxidante: método de captura do radical ABTS^{•+}</i>	41
4.2.9	<i>Avaliação da atividade antibacteriana</i>	42
4.2.10	<i>Atividade anti-inflamatória</i>	43
4.2.11	<i>Avaliação da Citotoxicidade</i>	44
4.2.12	<i>Análise dos dados</i>	44
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	45
6	PRINCIPAIS RESULTADOS	57
7	CONCLUSÃO	58
8	REFERÊNCIAS	59

1 INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana a múltiplos fármacos é um problema que provoca grande impacto no tratamento de infecções causadas por bactérias, pois torna a antibioticoterapia convencional ineficiente, limitando as possibilidades de combate ao microrganismo (ABDEL-SHAFI et al., 2019; LOUREIRO et al., 2016). O uso irracional de antibióticos é um fator relevante para a existência de microrganismos multirresistentes, pois leva a um processo de seleção das cepas mais fortes, as quais se proliferam e passam tal característica à diante por meio de mecanismos de transferência de genes específicos (LOUREIRO et al., 2016).

A *Staphylococcus aureus* é um exemplo de bactéria que conseguiu adquirir resistência a uma gama de antibióticos, dentre as quais, cepas resistentes a meticilina (MRSA) tomaram importância clínica significativa, pois estão associadas a quadros de difícil tratamento, que levam a progressão da infecção de forma mais grave, quando comparada as provocadas por cepas sensíveis (GARCIA et al., 2019). Durante algum tempo essas espécies eram evidenciadas apenas em âmbito hospitalar, mas logo foram observados casos de infecções comunitárias, levando ao aumento dos índices de morbimortalidade (MARTÍNEZ MEDINA et al., 2020; NITHYA et al., 2019).

Novas estratégias de tratamento são desenvolvidas na busca por regimes terapêuticos mais eficientes de combate aos microrganismos multirresistentes, dentre estas, os estudos voltados para a utilização de plantas medicinais com atividade antibacteriana tem-se tornado promissores, as quais vêm sendo testadas de forma isolada ou associada ao antibiótico, esta última baseia-se no sinergismo com o extrato da planta, o qual pode levar a um melhor resultado do que quando empregados de forma separada (FAUZIYAH et al., 2017; MARMITT et al., 2015).

O *Hibiscus sabdariffa* L. é uma espécie utilizada na medicina popular, principalmente na forma de chá obtido a partir da infusão dos cálices secos, para o tratamento de diversas patologias, como hipercolesterolemia, hipertensão, obesidade e infecções microbianas (BORRÁS-LINARES et al., 2015; DA-COSTA-ROCHA et al., 2014). Também é observado o emprego desta planta na indústria de alimentos e farmacêutica, na produção de bebidas, xaropes, corantes naturais, cosméticos e nutracêuticos, por ter uma composição química rica em substâncias que podem beneficiar a saúde, se empregadas de maneira correta (BORRÁS-LINARES et al., 2015).

Dentre as diversas propriedades farmacológicas atribuídas ao *H. sabdariffa* L. a ação antibacteriana tem despertado grande interesse à comunidade científica, visto que muitos resultados promissores têm sido mostrados em estudos com diferentes tipos de bactérias, como por exemplo, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* (TIMOTHY et al., 2017). De acordo com a literatura, o mecanismo pelo qual esta planta desenvolve tal efeito relaciona-se com a presença de metabólitos secundários da classe fitoquímica polifenóis, os quais possuem grande quantidade de grupos hidroxila em sua estrutura que formam complexos com proteínas e enzimas da bactéria promovendo sua inatividade (KHALAPHALLAH; SOLIMAN, 2014; TIMOTHY et al., 2017).

Em contrapartida, muitos estudos também relatam a potencial atividade anti-inflamatória associada ao hibisco, a qual atua reduzindo os níveis de mediadores pró-inflamatórios que tendem a levar a efeitos deletérios ao organismo (SHEN et al., 2016; SOGO et al., 2015). Dentre as causas associadas à indução da resposta inflamatória estão as infecções causadas por microrganismos, que são reconhecidos como estranhos, provocando a ativação do sistema imunológico (PATRICIO; PAIVA; BORREGO, 2019). Quando tal resposta torna-se persistente inicia-se o estado de inflamação crônica, com superprodução dos mediadores inflamatórios, os quais podem provocar o surgimento de diversas patologias (GERMOLEC et al., 2018; SHEN et al., 2016).

Por estar associado a tantos efeitos benéficos à saúde, a utilização de chás preparados a partir dos cálices do *H. sabdariffa* L. é algo relatado a bastante tempo, entretanto os dados literários a respeito de sua segurança biológica ainda são escassos e os que existem trazem resultados variáveis entre as diferentes espécies biológicas utilizadas nos ensaios (DACA-COSTA-ROCHA et al., 2014). Diante destas observações, este trabalho teve como finalidade avaliar a citotoxicidade do *H. sabdariffa* L, além das atividades anti-inflamatória e antibacteriana contra cepas de *S.aureus* resistente a múltiplos fármacos, buscando relacionar tais dados com a composição fitoquímica desta planta.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Plantas medicinais

A utilização de plantas medicinais com propriedades preventivas e/ou curativas é uma prática milenar que nas últimas décadas vem ressurgindo e ocupando um espaço importante no cuidado com a saúde do paciente, tornando-se um dos principais recursos para a medicina complementar alternativa e para a medicina tradicional (RIBEIRO, 2019). O emprego de plantas no cuidado com a saúde, inicialmente se deu de forma empírica pelos povos primitivos, por meio de tentativas com erros e acertos, o que foi relevante para a difusão do conhecimento das espécies que se adequavam ao uso medicinal (RODRIGUES et al., 2020).

O desenvolvimento de pesquisas investigativas a respeito das propriedades terapêuticas de plantas medicinais é um fator significativo para proporcionar o seu uso racional, dado a sua importância à população, principalmente em comunidades mais carentes e pouco desenvolvidas, onde há grande dificuldade para aquisição de medicamentos industrializados (FIGUEREDO et al., 2014; GADELHA et al., 2013). Entretanto o investimento brasileiro em estudos fitoquímicos e farmacológicos ainda é baixo, considerando a extensa biodiversidade que possui, havendo relatos investigativos de apenas 0,4% de sua flora (BRASIL, 2012).

A contribuição do reino vegetal para o desenvolvimento de medicamentos sintéticos, semissintéticos ou naturais é de longa data e perdura até os dias atuais, como um exemplo importante de medicamento natural, têm-se os fitoterápicos, os quais são obtidos a partir do processamento de plantas medicinais e possuem ação comprovada para prevenção, cura ou tratamento de determinada patologia, além dos riscos associados ao seu uso, os quais são validados a partir de estudos científicos ou de ensaios clínicos, como base em legislação específica (GADELHA et al., 2013). No fitoterápico os constituintes extraídos da planta atuam em conjunto, em diferentes alvos moleculares e de forma sinérgica para desenvolver o efeito biológico (THOMFORD et al., 2018).

2.2 Gênero *Hibiscus*

O gênero *Hibiscus* pertencente à família Malvaceae apresenta cerca de 300 espécies, as quais encontram-se espalhadas em regiões tropicais e subtropicais, tais como, América Central, África e Ásia, além de Brasil, Austrália, México e Porto Rico (COELHO; AMORIM, 2019). Em geral são arbustos a subarbustos que apresentam flores exuberantes de coloração

vermelha, rosa, amarela, entre outras, e podem ser empregados para fins ornamentais, alimentares e/ou medicinais (ESTEVEES et al., 2014).

No Brasil, algumas das espécies de *Hibiscus*, como *H. rosa-sinensis* L., *H. mutabilis* L., *H. radiatus* Cav. e *H. acetosella* Welw. ex Hiern, são cultivadas devido à bela aparência de suas flores para fins de ornamentação de vias públicas, jardins e canteiros (ESTEVEES et al., 2014). Além do seu emprego ornamental, as espécies *H. sabdariffa* L. e *H. acetosella* Welw. ex Hiern também são utilizadas na alimentação e na medicina popular (FAGUNDES; MASSUNAGA, 2016).

2.3 A espécie *Hibiscus sabdariffa* L.

H. Sabdariffa L. é uma planta nativa da África tropical e Ásia, classificada como arbusto, podendo atingir de um a três metros de altura. O caule é ramificado, composto por folhas organizadas de forma alternada e flores axilares, com cálice de coloração vermelha (COELHO; AMORIM, 2019). As sementes encontram-se no interior do cálice, possuem coloração marrom, tricomas por sua superfície e formato de rim. No Brasil algumas denominações populares que são empregadas para se referir a esta espécie são: hibisco, rosela, vinagreira, caruru azedo, azedinha e groselha (SOBRINHO; SANTOS, 2020). Sua classificação taxonômica é apresentada no Quadro1 e a imagem dos seus cálices na Figura 1.

Quadro 1: Classificação taxonômica do *H. sabdariffa* L.

Reino	Plantae
Divisão	Magnoliophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Malvales
Família	Malvaceae
Gênero	Hibiscus
Espécie	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.

Fonte: Adaptado de Sid-Ortega; Guerrero-Beltrán (2012).



Figura 1: Cálices e flor do *H. sabdariffa* L.

Fonte: Embrapa (2017).

Os cálices e flores do *H. sabdariffa* L. são tradicionalmente utilizados em diversos países para o preparo de produtos como bebidas, chás, geléias, saladas de frutas e xaropes (RIAZ; CHOPRA, 2018). Seu emprego na indústria de alimentos também é relatado pelo uso como pigmento natural e conservante, devido à presença de substâncias coloridas, como antocianinas, e antioxidantes como os polifenóis (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014).

Para fins medicinais, o chá preparado por infusão dos cálices de *H. sabdariffa* L. é utilizado popularmente na Índia, África e México, como diurético, hipotensor, colerético e estimulador do peristaltismo intestinal (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014). No Brasil, além do seu emprego no tratamento de hipertensão, é relatado o uso em casos de dislipidemia, transtornos gastrointestinais e infecções hepáticas (ARAUJO et al., 2017). Em outros países, não apenas os cálices e flores, mas também outras partes da planta são empregadas no cuidado à saúde, por sua ação antimicrobiana, anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, cardioprotetora, ansiolítica, hepatoprotetora, entre outros (SOBRINHO; SANTOS, 2020). Muitos estudos a respeito das propriedades farmacológicas do *H. sabdariffa* L. que foram realizados, *in vitro*, *in vivo* ou por triagens clínicas, apresentaram resultados que atestam a eficiência do seu uso popular (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014; RIAZ; CHOPRA, 2018).

2.4 Atividade antioxidante e metabólitos secundários do *H. sabdariffa* L.

O desequilíbrio fisiológico e a produção excessiva de espécies pró-oxidantes favorecem a ocorrência de danos teciduais, o que pode induzir doenças degenerativas, como aterosclerose, síndromes metabólicas, danos hepáticos e em outros órgãos, além de estar associado a processos cancerígenos, neste contexto, a ação antioxidante de alguns metabólitos secundários presentes em plantas pode ser uma alternativa para a profilaxia e redução dessas patologias (SID-ORTEGA; GUERRERO-BELTRÁN, 2012; SUBHASWARAJ et al., 2017). Deste modo, a atividade antioxidante associada aos compostos polifenólicos presentes no *H. sabdariffa* L. tem um papel relevante para este fim, pois reduz o processo de oxidação promovido por espécies reativas de oxigênio e formação de radicais livres (SUBHASWARAJ et al., 2017).

Metabólitos secundários são substâncias produzidas por plantas, que além de desempenhar papel em seu crescimento, defesa contra predadores, polinização e resistência a adversidades ambientais, possuem alta relevância para fins farmacológicos (FAGUNDES; MASSUNAGA, 2016; NABAVIA et al., 2020). Em uma avaliação fitoquímica dos cálices do *H. sabdariffa* L. realizada por Das (2014), diferentes metabólitos secundários foram encontrados no extrato etanólico e no extrato éter de petróleo, este trabalho demonstrou a presença de compostos polifenólicos, taninos, flavonoides, alcalóides, triterpenos, saponinas, esteróides e antraquinonas no extrato etanólico e composição similar no extrato éter de petróleo, exceto pela ausência de triterpenos e taninos.

Considerando a variedade de metabólitos da classe dos polifenóis presentes nesta planta, em um trabalho de revisão da literatura realizada por Da-Costa-Rocha et al. (2014), foi apresentado dados a respeito destes constituintes fitoquímicos já isolados, a partir do extrato aquoso dos cálices do *H. sabdariffa* L., os quais são listados no Quadro 2.

As atividades farmacológicas associadas aos polifenóis estão relacionadas ao número de hidroxilas presentes em sua estrutura química, que possuem capacidade de atuar como um doador de elétrons e hidrogênios, os quais são eficazes na estabilização de radicais livres e como quelante de íons metálicos (TITTONA et al., 2014). Como exemplos de polifenóis presentes no *H. sabdariffa* L. tem-se as antocianinas delfinidina-3-sambubiosídeo e cianidina-3-sambubiosídeo, mostradas na Figura 2, presentes em abundância nos cálices e folhas da planta (SOBRINHO; SANTOS, 2020).

Quadro 2: Constituintes fitoquímicos isolados a partir do extrato aquoso dos cálices de *H. sabdariffa* L.

Classe	Compostos
Ácidos orgânicos	Ácido hidroxicítrico, Ácido Hibiscus, Ácido Hibiscus glicosídeo, Ácido Hibiscus 6-metil éster
Antocianinas	Delfinidina-3-sambubiosídeo, Cianidina-3-sambubiosídeo
Flavonoides e ácidos polifenólicos	Ácido gálico, Ácido clorogênico, 5-hidroxi metilfurfural, Digalato de metila, Ácido 2-O-trans-cafeoil-hidroxicítrico, Ácido 5-cafeoilquínico, Miricetina-3-arabinogalactosídeo, Ácido 3-cafeoilquínico, Ácido protocatecuico, Ácido protocatecuico glicosídeo, Ácido coumaroilquinico, Quercetina-3-sambiosídeo, Quercetina-3-rutinosídeo, Ácido 5-O-cafeoilchiquímico, Kaempferol-3-O-sambubiosídeo, Quercetina-3-glucosídeo, Kaempferol-3-O-rutinosídeo, Derivado do feruloil, Metil-epigalocatequina, Miricetina, N-feruloiltiramida, Ácido 4-cafeoilquínico, Kaempferol 3-(p-coumarilglicosídeo), Quercetina, Ácido caféico, Éster galoil, Derivado do ácido feruloilquinico, aempferol-3-glicosídeo, Derivado da quercetina, Tilirosídeo

Fonte: Da-Costa-Rocha et al. (2014).

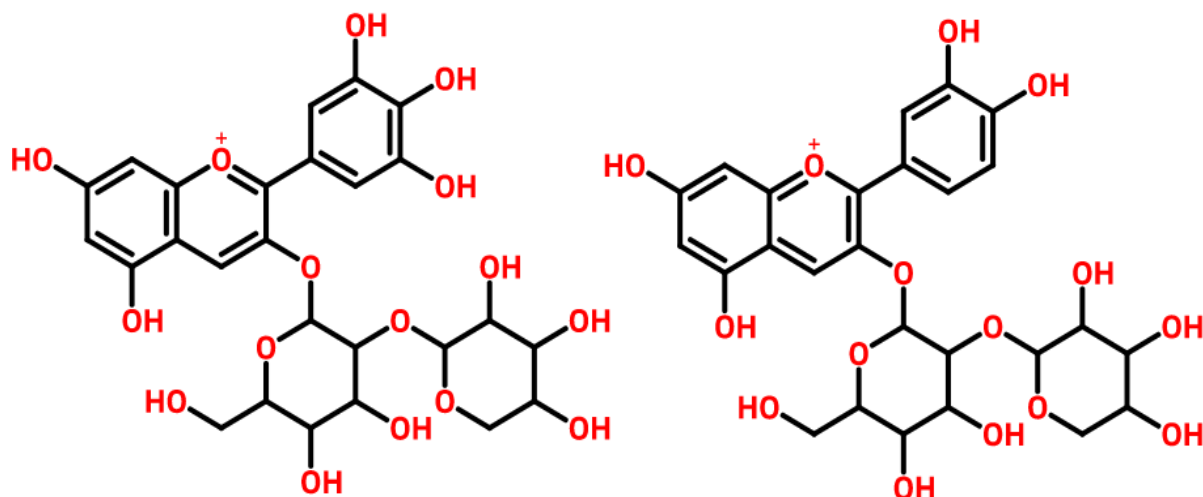


Figura 2: Estrutura química das antocianinas delfinidina-3-sambubiosídeo (à esquerda) e cianidina-3-sambubiosídeo (à direita).

Fonte: Adaptado de Sobrinho; Santos (2020).

2.5 Atividade antibacteriana

O uso irracional e inadequado de antibióticos entre humanos, animais e até mesmo em plantas, e a facilidade de disseminação de espécies microbianas em âmbito nacional e internacional favorece a crescente resistência bacteriana aos fármacos. Diversos exemplos de bactérias multirresistentes têm sido relatados, tais como, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina; *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii* e *Escherichia coli* resistentes aos carbapenêmicos e *Enterococcus faecium* resistentes a vancomicina (LOUREIRO et al., 2016). Neste contexto, extratos de muitas plantas que demonstram atividade antibacteriana, como a *Kaempferia galanga* L., *Piper crocatum* N.E. Br e o próprio *Hibiscus sabdariffa* L., têm sido estudados na busca pelo desenvolvimento de alternativas contra bactérias resistentes a medicamentos (FAUZIYAH et al., 2017).

Dentre os metabólitos secundários presentes no *H. sabdariffa* L., atribui-se a notável atividade antibacteriana aos compostos polifenólicos, cujo mecanismo de ação está relacionado à presença de muitos grupos hidroxilas em sua estrutura, os quais podem se ligar a proteínas e enzimas bacterianas provocando sua inativação (KHALAPHALLAH; SOLIMAN, 2014; TIMOTHY et al., 2017). Além disso, estas hidroxilas também podem se complexar com a parede bacteriana, diminuir os níveis de ferro e aumentar os números de hidrogênio, o que também favorece a inativação de enzimas e a inibição da capacidade de formação de biofilmes (TIMOTHY et al., 2017).

Muitas bactérias são descritas na literatura como sensíveis a extratos do *H. sabdariffa* L., destas pode-se citar: *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus aureus*, *Serratia marcescens*, *Clostridium sporogenes*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas fluorescens*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Actinomyces naeslundii*, *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Prevotella intermedia* (TIMOTHY et al., 2017). Para mais, um estudo realizado por Das (2014) atestou a atividade antimicrobiana do extrato etanólico e do extrato éter de petróleo, obtidos a partir dos cálices do *H. sabdariffa* L. contra os microorganismos *Salmonella enterica* sorovar typhimurium, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *Pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus cereus*, *Lactobacillus brevis* e *Aspergillus niger*.

2.6 A espécie *Staphylococcus aureus*

A espécie *S. aureus* pertence ao grupo dos cocos gram-positivos da família Micrococcae, é uma bactéria mesófila, com temperatura ótima de crescimento entre 35 e 37°C, considerada aeróbica ou anaeróbica facultativa, não formadora de esporos, imóvel e normalmente não encapsulada (SILVA, 2016). Pode ser comumente encontrada na microbiota das fossas nasais, pele e mucosas de seres humanos, o que possibilita sua rápida disseminação ao ambiente, tornando-se facilmente uma fonte de infecção tanto para o próprio indivíduo, quanto para aqueles que entram em contato com o mesmo (FREITAS et al., 2014; GARCIA et al., 2019).

Apesar de se tratar de uma bactéria comum da flora humana, ela também pode atuar como um agente patogênico, quando há redução da imunidade ou ruptura da barreira cutânea, o que geralmente tende a ocorrer em pacientes hospitalizados, principalmente com aqueles que portam algum aparelho ou dispositivo implantado, estando relacionada a infecções nasocomiais e comunitárias de variável gravidade, como foliculite, abscessos cutâneos e de tecidos profundos, osteomielite, endocardite, pneumonia, síndrome do choque tóxico e septicemia (KANE; CAROTHERS; LEE, 2018; O’GARA, 2017).

As enzimas, toxinas esfoliativas, exotoxinas, citotoxinas e toxinas superantigênicas produzidas por cepas de *S. aureus*, são fatores de virulência potencialmente envolvidos com a sua capacidade de causar infecções, dentre as enzimas pode-se citar as nucleases, lipases, proteases, collagenases, hialuronidases e catalases que atuam na invasão e sobrevivência do microorganismo no hospedeiro (FREITAS et al., 2014).

Entre toxinas produzidas pela *S. aureus* tem-se destaque para a hemolisina alfa (α -toxina) e leucocidinas bicomponentes, as quais possuem capacidade de formar poros na membrana da célula hospedeira e levar a ruptura e morte desta, mesmo em baixas concentrações. A α -toxina atua causando a lise de plaquetas, leucócitos, queratinócitos e de células endoteliais e epiteliais, através da interação com receptores de superfície de membrana chamados ADAM10 (desintegrina e metaloproteína 10) presentes nas células-alvo, levando a formação poros do tipo barril β (SEILIE; WARDENBURG, 2017). Em contrapartida, as leucocidinas bicomponentes são leucotóxicas para monócitos, neutrófilos e macrófagos, algumas também atuam na lise de eritrócitos, por mecanismo de formação de poros também do tipo barril beta (SEILIE; WARDENBURG, 2017; VANDENESCH; LINA; HENRY, 2012).

A capacidade da *S. aureus* produzir biofilmes é outro fator de virulência relevante para o surgimento de infecções e resistência a múltiplos fármacos, devido à dificuldade de penetração do agente antibacteriano na matriz polimérica que envolve os microrganismos (BOSCARIOL et al., 2018). Outros fatores como a natureza do biofilme, as alterações fisiológicas devido à taxa metabólica reduzida e existência de uma matriz protetora contra ação do medicamento e do sistema imunológico também aumentam a resistência (GRAF et al., 2019).

Biofilmes são formados por conjuntos de células bacterianas envolvidas em uma matriz extracelular de polímeros secretada pelas mesmas, podendo está fixado em uma superfície biótica ou abiótica (BOSCARIOL et al., 2018; OLIVEIRA et al., 2018). Inicialmente é essencial que ocorra o contato das bactérias planctônicas com a superfície por meio de interações físico-químicas, o qual é um processo reversível, em um segundo momento ocorre a adesão célula-célula e célula-superfície mediada por exopolissacarídeos, dando início ao estágio irreversível; o crescimento e maturação do biofilme envolvem a multiplicação das células e a produção de compostos extracelulares até o desenvolvimento de uma estrutura madura, a qual pode se desprender e formar novos biofilmes em outro ambiente (BASTOS, 2017). Neste cenário o processo de sinalização intercelular denominado *quorum sensing*, representa um fator relevante para desenvolvimento do biofilme, pois permite a modulação da densidade populacional, através de auto indutores secretados por tais bactérias (PAPENFORT; BASSLER, 2016).

Os mecanismos de obtenção de resistência bacteriana podem ser herdados ou adquiridos e levam a modificações na expressão de enzimas ou produção de novas moléculas com capacidade proteger o alvo molecular do antibiótico, modificá-lo ou expulsá-lo por

bombas de efluxo (CORREIA et al., 2017). A *S. aureus* resistentes a múltiplos fármacos é comumente relatada em infecções nasocomiais e comunitária, em que as cepas resistentes a meticilina (MRSA) representam uma grande preocupação, pois estão envolvidas em infecções críticas que levam a quadros clínicos piores do que aqueles envolvendo cepas sensíveis (HENDERSON; NIMMO, 2018; KONG; NEOH; NATHAN, 2016). No Quadro 3 está apresentado alguns exemplos de antibióticos e mecanismos de resistência que foram adquiridos por cepas de *S. aureus* ao longo dos anos.

Quadro 3: Exemplos de antibióticos e mecanismos de resistência aos quais cepas de *S. aureus* perderam sensibilidade (continua).

Antibiótico	Produtos/ Alteração	Mecanismo
Beta-lactâmicos (Penicilina e meticilina)	1 – Gene blaZ: beta-lactamases; 2 – Gene MecA (MRSA): Alterações na PBP2a	1 – Hidrólise do anel beta-lactâmico; 2 – Redução da afinidade de penicilinas por PBP.
Glicopeptídeos (vancomicina)	1 – Alteração na espessura da parede celular (VISA); 2 – Operon Van A (VRSA)	1 – Reduz a penetração dos glicopeptídeos; 2 – Hidrólise dos precursores D-ala - D-ala e síntese de resíduo D-Ala - D-Lac: Menor afinidade pela vancomicina.
Análogo do Fosfoenolpiruvato (Fosfomicina)	1 – Mutação no transportador GlpT e no UhpT; 2 – Gene fos-B: tiol-S-transferase; 3 – Mutações no gene murA.	1 – Redução da absorção da fosfomicina; 2 – Modificação enzimática da fosfomicina; 3 – Alteração no alvo molecular.
Lipopeptídeo cíclico (Daptomicina)	1 – Mutações em genes que afetam a carga ou composição do envelope celular.	1 – Redução da ligação da daptomicina à membrana citoplasmática.
Oxazolidinona (Linezolida e Tedizolida)	1 – Mutações no domínio V do gene 23S rRNA; 2 - Modificações ou deleções das proteínas ribossomais L3 e L4; 3 – Gene cfr: metiltransferase	1 e 2 – Redução da ligação do antibiótico no alvo molecular; 3 - Metilação da posição A2503 no rRNA 23S: modificação do alvo.

Quadro 3: Exemplos de antibióticos e mecanismos de resistência aos quais cepas de *S. aureus* perderam sensibilidade (continuação).

Antibiótico	Produtos/ Alteração	Mecanismo
Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas	1 – Presença de rRNA metilases codificadas por genes <i>ermA</i> , <i>ermB</i> ou <i>ermC</i> ; 2 – Gene <i>crf</i> : 23S rRNA metiltransferase; 3 – Genes <i>rplV</i> e <i>rplD</i> ; 4 - Genes <i>mph</i> : fosforilases 5 – Acetiltransferases; 6 - Gene <i>msr</i> (A): transportador ABC <i>Msr</i> (A); 7 – Gene <i>vga</i> (A): Transportador ABC; 8 - Bomba de efluxo <i>LmrS</i> ; 9 – Superexpressão do gene <i>mdeA</i> .	1 – Adição de grupos metil a um resíduo de adenina do rRNA 23S: modificação do alvo (R- MLE); 2 – modificação do alvo (R- LEA); 3 – Mutações nas proteínas ribossomais L22 e L4 (R – MLE); 4 – Inativação enzimática (R – M); 5 - Inativação enzimática (R – EA); 6 – Efluxo (R – MEB); 7 – Efluxo por transportador específico para estreptograminas tipo A; 8 – Efluxo ML; 9 – Resistência à estreptogramina virginiamicina.
Clorafenicol	1 – Genes <i>cat</i> : cloranfenicol acetiltransferases; 2 – Bomba <i>FexA</i> ou <i>LmrS</i> ; 3 – Gene <i>cfr</i> : rRNA metilase	1 – Inativação do cloranfenicol por acetilação na posição C3; 2 – Efluxo ativo; 3 - Modificação do alvo rRNA 23S na posição A2503.
Tetraciclinas	1 – Bombas Tet (K) e Tet (L); 2 – Genes <i>TetM</i> ou <i>TetO</i> .	1 – Efluxo de tetraciclinas; 2 – Proteção do alvo.
Aminoglicosídeos	1 – Enzima modificadora de aminoglicosídeos.	1 – Modificação enzimática e inativação.

Quadro 3: Exemplos de antibióticos e mecanismos de resistência aos quais cepas de *S. aureus* perderam sensibilidade (conclusão).

Antibiótico	Produtos/ Alteração	Mecanismo
Fluoroquinolonas	1 – Mutações nos genes <i>grlA</i> da topoisomerase IV e <i>gyrA</i> da DNA girase; 3 – Superexpressão de bombas de efluxo NorA, NorB e NorC.	1 – Modificação do alvo molecular; 3 – Efluxo de fluoroquinolonas.
Rifampicina	1 – Mutações no gene <i>rpoB</i> da RNA polimerase.	1 - Alteração do alvo que reduz a afinidade pela rifampicina.
Sulfonamidas (Trimetoprima-Sulfametoxazol)	1 - mutações no gene da diidropteroato sintase e da di-hidrofolato redutase	1 - Redução da afinidade de ligação com o alvo molecular.

Fonte: Adaptado de Vestergaard; Frees; Ingmer (2019).

Nota: MRSA (*S. aureus* Resistente a Meticilina), PBP (Proteína de Ligação a Penicilinas), VISA (*S. aureus* de Resistência Intermediária a vancomicina), VRSA (*S. aureus* Resistente a Vancomicina), GlpT (Transportador Parcialmente Constitutivo de Glicerol-3-fosfato), UhpT (Transportador de glicose – 6- fosfato), rRNA (Ácido Ribonucléico Ribossômico), R- MLE (Resistência à Macrolídeos, Lincosamidas e Estreptograminas), R- LEA (Resistência à Lincosamidas e Estreptograminas A), R – M (Resistência à Macrolídeos), R – EA (Resistência à Estreptograminas A), R – MEB (Resistência à Macrolídeos e Estreptograminas B), ML (Macrolídeos e Lincosamidas) ;DNA (Ácido Desoxirribonucléico).

Dessa forma, a realização de estudos que avaliem a atividade antibacteriana de plantas medicinais contra bactérias multirresistentes possui papel relevante no desenvolvimento de novas alternativas farmacológicas para o tratamento de infecções provocadas por tais microrganismos (ABDALLAH, 2016). Resultados promissores já foram observados em um estudo realizado por Hayati et al. (2012), no qual um extrato etanólico viscoso, obtido a partir da maceração de 1 Kg das flores secas do *H. sabdariffa* L. com etanol (96%), demonstrou alta capacidade de inibir o crescimento de cepas de *S. aureus* resistentes a metilicina em concentrações de 50% e 75%, os quais produziram zonas de inibição com diâmetros de 22,8 mm e 24,18 mm, respectivamente.

2.7 Atividade anti-Inflamatória

O processo inflamatório ocorre como uma resposta de defesa fisiológica contra agentes agressores, como patógenos, agentes físicos ou químicos, os quais são reconhecidos como estranhos por células do sistema imunológico, dando início a ações que objetivam a eliminação destes microrganismos/substâncias estranhas e/ou reparo de tecidos que foram lesionados (CHEN et al., 2018; GÜL, 2018). Durante o processo ocorre a produção e liberação de mediadores inflamatórios, dentre os quais têm-se o fator de necrose tumoral alfa (TNF – α), interleucinas (IL), quimiocinas, citocinas, ciclo-oxigenases e prostaglandinas (PG), que provocam alterações na permeabilidade vascular e recrutamento de células de defesa (OSPINA et al., 2013; SOGO et al., 2015).

A persistência do estímulo inflamatório estabelece a fase crônica deste processo, em que efeitos prejudiciais são observados devido à superprodução de mediadores inflamatórios, estando relacionados ao aparecimento diversas patologias (SHEN et al., 2016). Um exemplo é a produção exacerbada da IL-6, uma citocina pró- inflamatória que induz o aumento da síntese da proteína C reativa (PCR) pelo fígado, a qual atua reduzindo a formação de óxido nítrico (agente vasodilatador) por diminuir a atividade da enzima óxido nítrico síntase (iNOS) endotelial, a PCR também atua estimulando o aumento da síntese de endotelina-1 (vasoconstritora), levando dessa forma a redução da vasodilatação dependente do endotélio, aumento da força de cisalhamento e lesão dos vasos sanguíneos, o que estimula a formação de placas de ateroma e o aparecimento de trombos, que são fatores de risco para o surgimento de eventos cardiovasculares (TEIXEIRA et al., 2013).

Outra grande preocupação relacionada à cronicidade do processo inflamatório é o aumento da formação de espécies reativas de oxigênio (OSPINA et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2013), as quais estão associadas a ações deletérias em decorrência do estresse oxidativo

celular, provocando surgimento de doenças crônicas, como síndromes metabólicas e doenças degenerativas (SUBHASWARAJ et al., 2017).

Desta forma, plantas com potencial atividade anti-inflamatórias, como o *H. sabdariffa* L. podem contribuir para a redução desses eventos danosos ao organismo, estudos recentes tem demonstrado a ação *in vitro* das antocianinas, delphinidina e delphinidina-3-sambubiosídeo presentes nesta planta, na supressão da expressão de mediadores pró-inflamatórios, como o TNF-alfa, IL-6 e proteína 1 quimioatrativa de monócitos (MCP-1) (SOGO et al., 2015).

Em testes *in vivo* também foi verificado a ação anti-inflamatória do *H. sabdariffa* L., em que um extrato etanólico produzido a partir de seus cálices demonstrou capacidade de inibir significativamente o edema provocado por xileno em orelhas de ratos de maneira proporcional a dose (SHEN et al., 2016). Para além, também é observado que as substâncias polifenólicas extraídas do hibisco são capazes de reduzir o processo inflamatório induzido por lipopolissacarídeo (LPS) em ratos (SHEN et al., 2016; SOGO et al., 2015).

2.8 Toxicidade do *H. sabdariffa* L.

Plantas medicinais são comumente utilizadas por diversas pessoas no tratamento de problemas de saúde, as quais são vistas na maioria das vezes como seguras em decorrência de sua origem natural. No entanto, este pensamento está associado ao surgimento de intoxicações, pois estas também podem produzir substâncias tóxicas ao indivíduo capazes de provocar eventos patológicos, sendo assim indicado a utilização apenas de plantas conhecidas e devidamente identificadas (CAMPOS et al., 2016). Dados levantados pelo Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (2018) mostram que em 2016 foram registrados 1.207 casos de intoxicações por plantas no Brasil, em que 36,29 % destes ocorreram em crianças entre 1 a 4 anos de idade.

A ação tóxica da espécie vegetal pode variar de acordo com fatores relacionados tanto a planta quanto ao indivíduo, para o primeiro têm-se variações em decorrência da dose utilizada, forma de estocagem, uso concomitante de outras plantas, contaminação por produtos químicos, entre outros; como fatores relacionados ao indivíduo têm-se a idade, estado nutricional, presença de doenças que dificultam o metabolismo, gravidez e lactação (CAMPOS et al., 2016).

O *H. sabdariffa* L. é um exemplo de planta utilizada a bastante tempo pela população, os estudos *in vivo* acerca da sua toxicidade em diferentes espécies de ratos e camundongos trazem resultados variáveis a respeito de sua dose letal ₅₀ (DL₅₀), visto que, em um ensaio realizado com camundongos albinos durante quatorze dias, o extrato aquoso dos cálices desta

planta obteve um $DL_{50} > 5000$ mg/kg de peso corpóreo/dia, em contrapartida um ensaio realizado com ratos machos Charles Foster demonstrou letalidade total em todos os grupos tratados após 28 dias de administração de doses de 2000 mg/kg/dia (DA-COSTA-ROCHA et al., 2014).

A variabilidade quanto a toxicidade do *H. sabdariffa* L. também foi observada em bioensaios de citotoxicidade e genotoxicidade sobre células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*, em que no estudo realizado por Lima et al. (2018) pode ser demonstrado a ausência de tais ações do chá obtido a partir da infusão das flores do *H. sabdariffa* L. nas concentrações de 0,10; 0,20 e 0,40 g/ml. Entretanto em outro estudo realizado por Rocha et al. (2017), foi observado redução no crescimento das raízes do *Allium cepa* no chá a 5 g/L e inibição total do crescimento nas concentrações de 10 e 20 g/L, evidenciando dessa forma a citotoxicidade de tal planta neste ensaio.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a composição fitoquímica e as ações biológicas (antibacteriana, anti-inflamatória e citotóxica) do extrato etanólico e frações de *H. sabdariffa* L frente a cepas de *S. aureus* multirresistentes.

3.2 Objetivos específicos

- Analisar qualitativamente a fitoquímica do extrato etanólico obtido a partir dos cálices secos do *H. sabdariffa* L. e suas frações (acetato de etila e metanólica);
- Quantificar os principais metabólitos secundários sugeridos na literatura como portadores de ação antibacteriana e anti-inflamatória (compostos polifenólicos e flavonoides);
- Determinar a atividade antioxidante do extrato etanólico e frações por duas metodologias comumente utilizadas na avaliação de tal atividade, o ensaio de captura do radical DPPH e do ABTS;
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato etanólico de *H. sabdariffa* L. contra cepas de *S. aureus* resistente a múltiplos fármacos;
- Avaliar a potencial atividade anti-inflamatória do extrato e frações do *H. sabdariffa* L.;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato e frações do *H. sabdariffa* L..

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Solventes e reagentes: Cálices secos do *Hibiscus sabdariffa* L., água destilada, álcool etílico absoluto (etanol), sílica gel 60 (0,063-0.200mm), hexano, clorofórmio, acetato de etila, álcool metílico (metanol), ácido clorídrico, reagente de Mayer, reagente de Wagner, acetato de cobre, acetato de chumbo, cloreto férrico, fita de magnésio, hidróxido de amônio, sulfato de sódio anidro, anidrido acético, ácido sulfúrico, reagente de Folin-Ciocalteu, carbonato de sódio anidro, sulfato de alumínio, quercetina, 2,2'- Diphenyl-1-ptylhydrazyl (DPPH), ácido gálico, 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS), persulfato de potássio, cepas de *S. aureus*, caldo Luria Bertani, glicerol, ágar Brain Heart Infusion (BHI), solução padrão McFarland 0,5, água estéril, ágar Mueller Hinton, cultura de macrófagos RAW 264.7, meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM) suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico Pen & Strep, lipopolissacarídeo bacteriano, reagente de Griess, 2,3-bis-(2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil)-2H-tetrazólio-5-carboxanilida (XXT).

Equipamentos: Moinho de facas, balança analítica, chapa aquecedora, evaporador rotativo, bomba de vácuo, espectrofotômetro UV-Vis, espectrofotômetro de infravermelho, banho ultrassom, banho Maria, capela de exaustão, autoclave, estufa incubadora BOD, refrigerador, forno micro-ondas, capela microbiológica, paquímetro digital, pHmetro, leitor de microplaca.

Instrumentos e vidrarias: balões volumétricos de 250, 100, 50 e 10 ml, béqueres de 250, 100, 50 e 25 ml, balões de fundo redondo de 250 e 500 ml, frasco de vidro tipo penicilina, Erlenmeyer de 250 ml, tubos de ensaio, estante para tubos de ensaios, bastões de vidro, espátulas, pinça anatômica, garra para bureta, coluna cromatográfica, suporte universal, papel-filtro, funil para filtração simples, funil de extração líquido-líquido, funil Büchner, Kitassato, alonga para Kitassato, grau e pistilo, pipeta graduada, pipetador tipo pêra, pipeta Pasteur de vidro, tetina de silicone, micropipetador, ponteiras, placas de Petri, agitador de tubos tipo Vórtex, tubos Eppendorf, placa de cultura de 96 poços.

4.2 Métodos

4.2.1 Obtenção do material vegetal

O material vegetal, cálices secos do *H. sabdariffa* L. foi obtido da empresa Nutri Ervas Indústria e Comércio LTDA, CNPJ: 06.050.815/0001-61.

4.2.2 Preparo do extrato bruto etanólico

A obtenção do extrato bruto etanólico foi realizada segundo o método descrito por Lusida et al. (2017), com algumas modificações. Para tal, as flores secas do *Hibiscus sabdariffa* L. foram pulverizadas em moinho de facas, por conseguinte o pó obtido foi pesado em balança analítica, obtendo-se uma massa de 200 g, da qual utilizou-se 50 g para o preparo do extrato etanólico na proporção 1:4 (material vegetal/álcool etílico absoluto), através do processo de maceração por 24 horas, filtração simples e troca do solvente após este tempo, com repetição do processo até finalização da extração, observada pela coloração mais clara do meio. Após isso, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo a aproximadamente 60°C, com obtenção de uma massa final seca do extrato bruto de 12,638 g.

4.2.3 Fracionamento do extrato

No fracionamento do extrato bruto etanólico utilizou-se uma coluna filtrante, para isso foi realizada a incorporação de 6,5 g deste em sílica até a obtenção de uma mistura homogênea, a qual foi transferida para um funil de Büchner previamente coberto com papel-filtro umedecido com o solvente da filtração, seguido da aplicação de outro papel-filtro na superfície da mistura. As frações foram obtidas por filtração a vácuo, utilizando os solventes: hexano (200 mL), clorofórmio (200 mL), acetato de etila (300 mL) e metanol (300 mL), adicionando-os de 50 a 50 mL na ordem do menos polar para o mais polar. Após isso, as frações foram levadas para o evaporador rotativo, com término da secagem em capela de exaustão e, por fim, pesagem em balança analítica, com obtenção das seguintes massas: fração hexano = 0,0012 g; fração clorofórmio = 0,219 g; fração acetato = 4,08 g; fração metanol = 1,879 g. Tendo em vista o rendimento insuficiente das frações hexano e clorofórmio para a realização de todos os ensaios, apenas as frações acetato, metanol e extrato bruto foram avaliadas.

4.2.4 Testes fitoquímicos

A análise fitoquímica qualitativa foi realizada segundo a metodologia descrita por Matos (2009), para determinação de alcaloides, taninos, flavonoides, saponinas, antraquinonas, triterpenos e esteroides no extrato etanólico e nas frações obtidas a partir deste, para isso seguiu-se os passos descritos abaixo:

1 – Alcaloides: 10 mg de cada amostra foi diluída com 5 mL de ácido clorídrico a 5%, seguido da distribuição destas em dois tubos de ensaio e adição de 3 gotas do reagente de Mayer em um tubo e do reagente de Wagner em outro, observando a formação de precipitado.

2 – Taninos: 10 mg de cada amostra foi diluída com 5 mL de água destilada, seguido por distribuição destas em três tubos de ensaio e adição de 3 gotas de acetato de cobre no tubo 1, acetato de chumbo no 2 e cloreto férrico no 3, observando a formação de precipitado ou surgimento de cor verde ou azul (no tubo que foi adicionado o cloreto férrico).

3 – Flavonoides: 10 mg de cada amostra foi diluída com 5 mL de etanol 70% e transferidas para tubos de ensaio, nos quais foi adicionado 35 mg de raspas de magnésio e 1 mL de ácido clorídrico, observando surgimento de cor rósea ou vermelha.

4 – Saponinas: 10 mg de cada amostra foi diluída com 5 mL de água destilada, transferidas para tubos de ensaio e agitadas de forma contínua por três minutos, observando persistência de espuma após 15 minutos.

5 – Antraquinonas: 10 mg de cada amostra foi diluída com 5 mL de hidróxido de amônio a 10%, observando surgimento de coloração rósea ou vermelha.

6 – Triterpenos e esteroides: 10 mg de cada amostra foi diluída com 5 mL clorofórmio, seguido da filtração simples em algodão com sulfato de sódio anidro. O filtrado foi transferido para tubos de ensaio, onde foi adicionado 1 mL de anidrido acético e 1 mL de ácido sulfúrico, observando surgimento de coloração verde e/ou vermelho acastanhado.

4.2.5 Determinação de fenóis totais

A determinação quantitativa dos fenóis totais foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu por espectrofotometria na região do visível, com base na metodologia descrita por Sousa et al. (2007), com algumas modificações. Para tal, foi feito o preparo de soluções metanólicas das amostras na concentração de 1 mg/mL em balões volumétricos de 10 mL. Por conseguinte, 1 mL de cada solução preparada foi pipetado em outros balões volumétricos de 10 mL, com adição de 6 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu, após homogeneização por 3 minutos adicionou-se 1 mL de solução saturada de carbonato de sódio (Na_2CO_3) a 15%, seguido pelo preenchimento do volume até o menisco com água destilada, obtendo-se a concentração final de 0,1 mg/mL para todas as amostras.

Todas as soluções foram preparadas em triplicata e guardadas por 1 hora em local sem luminosidade, para enfim realizar a leitura no espectrofotômetro UV-vis no comprimento de onda de 750 nm, utilizando como branco uma mistura obtida a partir de todos os reagentes empregados com exceção da amostra e, para zerar o equipamento antes das leituras apenas

metanol, as absorvâncias obtidas na leitura do branco foram subtraídas das absorvâncias das amostras.

A quantificação dos fenóis totais foi realizada com base na média das absorvâncias das amostras, aplicada a uma curva de calibração de ácido gálico, construída a partir das leituras da absorvância a 750 nm de soluções de ácido gálico nas concentrações de 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 e 10,0 µg/mL, após reagirem com os mesmos reagentes que as amostras. Obtendo-se uma equação para a curva de calibração de $y = 0,0723x + 0,0241$ e valor de $R^2 = 0,993$, sendo y a absorvância de cada amostra e x a concentração de fenóis totais em mg de EqAG (equivalente de ácido gálico)/g de amostra.

4.2.6 Quantificação de flavonoides

A quantificação de flavonoides nos extratos e frações seguiu a metodologia descrita por Oppermann et al. (2017) com algumas modificações. Para tal, foram preparadas soluções metanólicas das amostras a serem analisadas na concentração de 10 mg/mL e uma solução metanólica de sulfato de alumínio a 5%, em seguida foi pipetado 500 µL das amostras, 250 µL da solução de sulfato de alumínio e 4,25 mL de metanol em tubos de ensaio em triplicata, obtendo-se a concentração final para as amostras nos tubos de 1,0 mg/mL.

Uma curva de calibração com o padrão quercetina foi construída a partir de soluções preparadas nas concentrações de 10; 25; 50; 75, 100 e 150 µg/mL, que após ser aplicado o mesmo procedimento feito com as amostras do material vegetal, foi obtido as seguintes concentrações finais para a construção da curva: 1,0; 2,5; 5,0; 7,5, 10,0 e 15,0 µg/mL. Utilizou-se como branco todos os reagentes, com exceção da amostra ou da quercetina, e sua absorvância foi subtraída nos cálculos. Para zerar o equipamento empregou-se apenas metanol.

Após 30 minutos em ambiente escuro, as amostras foram lidas no espectrofotômetro a 425 nm, obtendo-se uma equação para a curva de calibração de $y = 0,0802x + 0,0216$ e valor de $R^2 = 0,999$, em que considerou-se y a absorvância de cada amostra e x a concentração de flavonoides expressos em mg de EQ (Equivalente de Quercetina) por grama de amostra.

4.2.7 Atividade antioxidante: método de captura do radical DPPH•

A atividade antioxidante realizada pelo método do DPPH teve como base a metodologia descrita por Pires et al. (2017), na qual é avaliada a capacidade de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH) por substâncias antioxidantes presentes na

amostra, as quais provocam a redução do DPPH e mudança de cor do meio de púrpura para amarelo, com conseqüente redução nos valores de absorbância.

A determinação da atividade antioxidante foi realizada com o extrato etanólico e frações, para isso foram preparadas soluções nas concentrações de 125; 250; 500; 1000 e 2000 µg/mL em balões volumétrico de 10 mL, utilizando metanol como diluente, em seguida foi pipetado em diferentes tubos de ensaio 0,2 mL de cada uma das amostras e 2,8 mL de uma solução metanólica de DPPH a 80 µmol.L⁻¹, obtendo-se concentrações finais das amostras de 8,33; 16,67; 33,33; 66,67 e 133,33 µg/ml, respectivamente. Utilizou-se como branco das amostras 0,2 mL das soluções preparadas inicialmente, acrescidas de 2,8 mL de metanol. A solução controle foi preparada a partir da mistura de 0,2 mL de metanol com 2,8 mL da solução de DPPH, tomando como branco do controle apenas metanol.

Como padrão de comparação para os resultados foi utilizado uma solução metanólica de ácido gálico preparada a 0,1 mg/mL, a partir da qual foi feito diluições para construção da curva padrão, os volumes utilizados são descritos no Quadro 4.

Quadro 4: Volumes utilizados da solução estoque de ácido gálico a 0,1 mg/mL para a construção da curva padrão.

Concentração final (µg/mL)	Solução DPPH (µL)	Ác. gálico 0,1 mg/ml (µL)	Metanol (µL)	Volume final (µL)
Branco	-	-	3000	3000
0,0	2800	-	200	3000
0,5	2800	15	185	3000
1,0	2800	30	170	3000
1,5	2800	45	155	3000
2,0	2800	60	140	3000

Fonte: Adaptado de Pires et al. (2017).

Todas as misturas foram realizadas em triplicata e mantidas em ambiente sem luminosidade por 30 minutos, para então seguir com as leituras das absorbâncias em espectrofotômetro UV-vis a 517 nm, seguindo a ordem da menor concentração para a maior e iniciando a partir das amostras do controle.

A média dos valores de absorvância obtidos para cada amostra foi subtraída pela média dos valores de absorvância do branco e então aplicados na equação abaixo, para determinação da percentagem de atividade antioxidante (% AA), que é proporcional à redução do radical DPPH.

$$\% \text{ AA} = (\text{Abs do controle} - \text{Abs da amostra}) \div (\text{Abs do controle}) \times 100$$

Onde Abs do controle refere-se a absorvância da solução contendo apenas metanol e DPPH e, Abs da amostra corresponde a solução contendo a amostra e o DPPH.

Com base nos resultados de porcentagem de redução do DPPH é possível calcular a CE_{50} , que é a concentração da amostra capaz de reduzir 50% do DPPH no meio, para isso foi plotado uma curva com a % de redução do DPPH no eixo Y e a concentração dos extratos ($\mu\text{g/mL}$) no eixo X, obtendo uma equação da reta do tipo $y = ax + b$.

Onde:

$y = \% \text{ redução do DPPH}$

$x = \text{CE}_{50} (\text{mg/mL})$

4.2.8 Atividade antioxidante: método de captura do radical ABTS^{•+}

A determinação do potencial antioxidante através do ensaio de sequestro do ABTS^{•+} [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] seguiu a metodologia descrita por Torres et al. (2017) com algumas modificações, a qual se baseia na redução do radical catiônico de cor verde/azulada por substâncias antioxidantes do meio, com diminuição da coloração e consequente decaimento da absorvância, a qual é comparada com a absorvância do radical que não passou pela reação, sendo o potencial antioxidante inversamente proporcional a absorvância das amostras.

O ensaio foi realizado para o extrato bruto e frações, para tal foi preparado previamente uma solução de ABTS a 7 mM e uma solução de persulfato de potássio a 140 mM em balões volumétricos de 10 mL utilizando água destilada, por conseguinte 5 mL da primeira solução foi misturada com 88 μL da segunda, essa mistura foi mantida em temperatura ambiente e no escuro por 16 horas para obtenção do radical catiônico ABTS^{•+}, após decorrido o tempo a solução resultante foi diluída com metanol até a obtenção de uma absorvância entre 0,8-1,0 a 734 nm (iniciando a diluição na proporção 1:40).

As amostras a serem analisadas foram preparadas da mesma forma e concentrações descritas na metodologia anterior (método de captura do DPPH), tendo sido também utilizados os mesmos volumes (200 μL para as amostras e 2.800 μL para a solução radicalar), foi feito o branco das amostras para cada uma das concentrações. Como controle utilizou-se

2.800 µL do ABTS^{•+} acrescido de 200 µL de metanol e como padrão de referência para os resultados foi utilizado o ácido gálico nas concentrações de 0,0; 0,25; 0,5; 1,0 e 1,5 µg/ml, preparado de forma similar a utilizada na metodologia anterior, alterando apenas o radical da reação. Todas as amostras foram preparadas em triplicata, guardadas em ambiente sem luminosidade por 20 minutos e então lidas no espectrofotômetro UV-vis a 734 nm.

Os cálculos para determinar a percentagem de atividade antioxidante e CE₅₀ foram realizados da mesma forma aos aplicados ao método de captura do DPPH.

4.2.9 Avaliação da atividade antibacteriana

4.2.9.1 Microorganismos utilizados

Para análise do efeito antimicrobiano foram utilizadas 3 tipos de cepas de *Staphylococcus aureus*, isoladas de pacientes internados em serviço de saúde do município de Barreiras (BA). As cepas foram mantidas congeladas a – 12 °C em caldo Luria Bertani acrescido de glicerol. No Quadro 5 pode ser observado as amostras, que se mostraram resistentes e que são cepas MRSA, selecionadas para serem utilizadas no ensaio.

Quadro 5: Classificação das amostras de *S. aureus* utilizadas nos ensaios de atividade antibacteriana do *H. sabdariffa* L.

Cepa	Microorganismo	Amostra	Resistente	MRSA
1	<i>S. aureus</i>	22G	Sim	Sim
2	<i>S. aureus</i>	1SGB	Não	Não
3	<i>S. aureus</i>	11iB	Sim	Sim

Fonte: Autoria própria.

4.2.9.2 Preparação do Inóculo

Antes dos ensaios, as cepas foram reativadas em caldo BHI e incubadas a 35 ± 2°C por 24 horas. A turbidez foi ajustada para solução padrão McFarland 0,5; resultando em uma suspensão de aproximadamente 1.10⁸ UFC/mL.

4.2.9.3 Ensaio de Difusão em Ágar

A realização do ensaio de difusão em ágar para avaliação da atividade antibacteriana do *H. sabdariffa* L. frente às cepas selecionadas, foi aplicado ao extrato etanólico de acordo

com a metodologia descrita por Gonelimali et al. (2018). Para tal foram preparadas diluições seriadas do extrato em água estéril nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,35; 15,63; 7,81; 3,9 mg/ml. Em seguida 100 µL de cada inóculo foi transferido para tubos de ensaio contendo ágar Mueller-Hinton fundido (com temperatura aproximada de 50°C), homogeneizado em agitador tipo vórtex e transferido para placas de petri estéreis. Após solidificação do ágar, quatro poços foram feitos em cada uma das placas, os quais foram preenchidos com 100 µl dos extratos nas diferentes concentrações preparadas inicialmente. Por conseguinte as placas foram resfriadas por 30 minutos e em seguida, incubadas $35 \pm 2^\circ\text{C}$ por 18 horas, para então mensuração dos halos de inibição utilizando paquímetro digital. O ensaio foi realizado em duplicata e repetido uma segunda vez em dia diferente.

4.2.10 Atividade anti-inflamatória

4.2.10.1 Cultura Celular

Macrófagos RAW 264.7 foram cultivados em meio Eagle modificado de Dulbecco (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico Pen & Strep, em uma atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C.

4.2.10.2 Atividade Anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória foi avaliada através do ensaio com macrófagos RAW 264.7 induzidos com o lipopolissacarídeo bacteriano (LPS), essa indução provoca a produção de Óxido Nítrico (NO) por tais células, que na presença de substâncias com atividade anti-inflamatórias tende a ter sua síntese reduzida. Para tal, as células RAW foram semeadas, na concentração de 1.10^5 células/poço, em placa de cultura de 96 poços e tratadas por 1 hora com 100 µl dos extratos nas concentrações 12,5; 25; 50 e 100 mg/ml (preparados utilizando o mesmo meio de cultura do cultivo celular). Após decorrido o tempo, estas foram incubadas com LPS a 200 ng/mL por 24 horas em atmosfera contendo 5% de CO₂ a 37°C. A concentração de NO no meio, foi medida indiretamente por seu principal metabólito formado após reagir com o reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de dicloridrato de N- (1-naftil) -etilenodiamina e 5% de ácido fosfórico), o nitrito. Para isso, 50 µl de cada sobrenadante foi misturado com mesmo volume do reagente de Griess e após decorrido 10 minutos em temperatura ambiente e sem luminosidade, as amostras foram lidas em leitor de microplaca a 540nm.

O ensaio foi realizado em triplicata, teve como controle positivo as células tratadas apenas com o LPS e como controle negativo as células apenas com o meio de cultura. Em vista de observar a interferência que a coloração dos extratos poderia causar estes também foram lidos nas mesmas concentrações descritas para o ensaio, mas sem ter participado das reações.

4.2.11 Avaliação da Citotoxicidade

O ensaio de citotoxicidade dos extratos foi realizado através do método XTT, o qual avalia a viabilidade celular por uma reação colorimétrica, desenvolvida através da biorredução do sal tetrazólico XTT por desidrogenases mitocondriais formando o formazan, um produto de coloração de coloração violeta, essa reação ocorre somente em células viáveis. Para tal, 100 µl das células RAW (aproximadamente 1.10^5 células/poço), utilizadas no ensaio de atividade anti-inflamatória e após ser retirado o sobrenadante, foram e incubadas com 50 µl da mistura de marcação XTT (5 ml de reagente de marcação XTT com 0,1 ml de reagente de acoplamento de elétrons) por 4 horas, em atmosfera umidificada com 5% de CO₂ a 37°C. Após decorrido o tempo o sobrenadante foi retirado e lido em leitor de microplaca a 590 nm.

O ensaio foi realizado em triplicata, teve como controle positivo as células tratadas apenas com o XTT e como controle negativo as células apenas com o meio de cultura.

4.2.12 Análise dos dados

O software Microsoft Office Excel foi utilizado na realização da análise estatística dos dados e construção dos gráficos de fenóis totais e flavonóides e, para avaliação da linearidade e significância dos resultados através Análise de Variância (ANOVA), bem como, para a avaliação da diferença estatística entre as metodologias aplicadas no ensaio de atividade antioxidante empregando o teste F e o teste T student, utilizando um nível de confiança de 95%. A análise estatística dos dados de atividade antibacteriana foi realizada pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade e, os gráficos da atividade anti-inflamatória e citotoxicidade foram construídos utilizando o software GraphPad Prism.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise fitoquímica qualitativa do extrato bruto etanólico (EBE), obtido a partir dos cálices secos do *H. sabdariffa* L., e de suas frações acetato (FrAc) e metanólica (FrM) está apresentada na Tabela 1, em que é possível verificar a presença de metabólitos secundários da classe polifenóis, em especial flavonoides.

Tabela 1: Análise fitoquímica qualitativa do extrato etanólico e frações metanólica e acetato de etila.

Teste	EBE	FrM	FrAc
Alcaloides	-	-	-
Antraquinonas	-	-	-
Flavonoides	+	+	-
Fenóis	+	+	+
Taninos	-	-	-
Saponinas	-	-	-
Triterpenos	+	+	+
Esteroides	+	+	+

Fonte: Autoria própria.

Nota: + (presente), - (ausente), EBE (Extrato Bruto Etanólico; FrM (Fração Metanólica), FrAc (Fração Acetato).

Flavonóides podem ser encontrados nas plantas em sua forma livre (aglicona) ou ligados a glicosídeos, o que eleva sua polaridade em decorrência ao aumento do número de hidroxilas, fazendo com que sejam solúveis em solventes mais polares (NABAVIA et al., 2020). A capacidade dos solventes empregados em reter tais metabólitos relaciona-se a eficiência destes em solubilizá-los, ao se tratar de substâncias polares é observado um melhor desempenho com a utilização de solventes polares, visto que isso favorece a existência de interações mais fortes entre o soluto e o solvente, capaz de vencer as forças de atração entre solvente-solvente e soluto-soluto. A presença de grupos polares, estrutura química e massa molecular (M) dos solventes são fatores que influenciam no momento dipolo (μ) da molécula e consequentemente em sua polaridade (MARTINS et al., 2013). Assim, solventes como acetato de etila que possui o μ 1,78 e M 88,1 g/mol, ao ser comparado com o etanol que tem μ

1,69, mas M de 46,1 g/mol (GOUAL; FIROOZABADI, 2002) ou metanol com μ 1,70 e M de 32,04g/mol, tende a ter uma menor eficiência em solubilizar um soluto de elevada polaridade por ter uma cadeia carbônica e estrutura química maior (MARTINS et al., 2013).

Nesta pesquisa também pôde ser observado resultados positivos para os metabólitos triterpenos e esteróides em todas as amostras analisadas. Triterpenos são moléculas derivadas de unidades de isopreno que se unem formando um esqueleto base de trinta carbonos, tais metabólitos servem como precursores para a formação de outros derivados a partir da variação dos grupos funcionais (como exemplo: carbonila, glicosil, hidroxila, carboxila e metila) que podem estar ligados ao esqueleto carbônico (GHOSH, 2016). Além de desempenharem papel no desenvolvimento e defesa da planta contra patógenos, seu emprego na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia torna um alvo relevante de pesquisas científicas (GHOSH, 2017). Os esteróides são moléculas de baixo peso molecular derivadas de triterpenos, mais especificamente do S-esqualeno-2,3-epóxido, esses metabólitos desenvolvem ações essenciais na fisiologia e bioquímica da espécie em que se apresentam e, assim como os triterpenos, possuem importante papel comercial, visto que são utilizados na produção de medicamentos, como anticoncepcionais, agentes de ação cardiovascular e fármacos para o tratamento da osteoporose (GARG et al., 2020).

Os resultados vistos aqui podem ser comparados com dados existentes na literatura, como os apresentados por Abdallah (2016b), em que ao avaliar o extrato metanólico (80%) dos cálices de *H. sabdariffa* L. obteve resultados positivos para compostos fenólicos e flavonóides, outros metabólitos que também se mostraram presentes foram saponinas e alcalóides. Para além, foi verificado a presença dos metabólitos, taninos, antraquinonas, carotenóides, saponinas, flavonóides, glicosídeos, triterpenos e esteróides, com ausência de alcalóides, em uma análise fitoquímica do extrato aquoso e hidro-etanólico dos cálices do *H. sabdariffa* realizada por Mensah e Golomeke (2015).

Ao avaliar as informações da literatura e os resultados obtidos neste estudo pode-se inferir a existência de variabilidade dos dados encontrados para análise fitoquímica qualitativa, algo que não é incomum, visto que fatores como, solvente de extração, estado do material-vegetal (seco ou in natura) e condições de crescimento da planta podem influenciar no teor de seus constituintes (SILVA et al., 2019).

Os resultados da análise quantitativa para determinação de fenóis totais e flavonoides são descritos nas Figuras 3 e 4 respectivamente, comparando os achados das amostras analisadas, tem-se maiores valores destes metabólitos secundários para o extrato etanólico

(34,0 mg EqAG/g e 3,43 mg EqQ/g) e fração metanólica (44,7 mg EqAG/g e 4,31 mg EqQ/g).

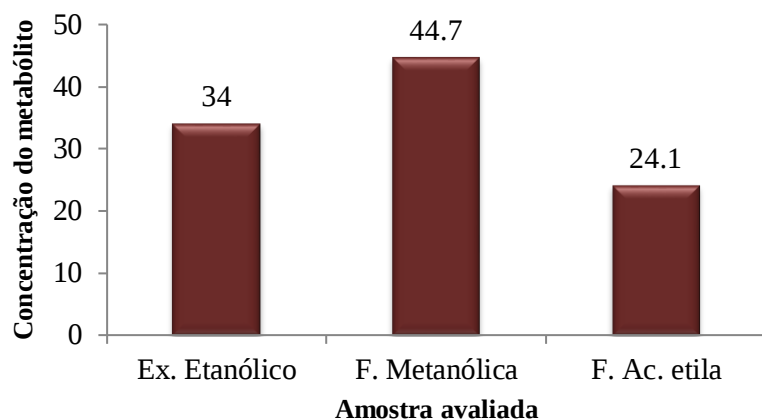


Figura 3: Concentração de fenóis totais em mg EqAG/g de amostra para o extrato etanólico e frações.

Fonte: Autoria própria.

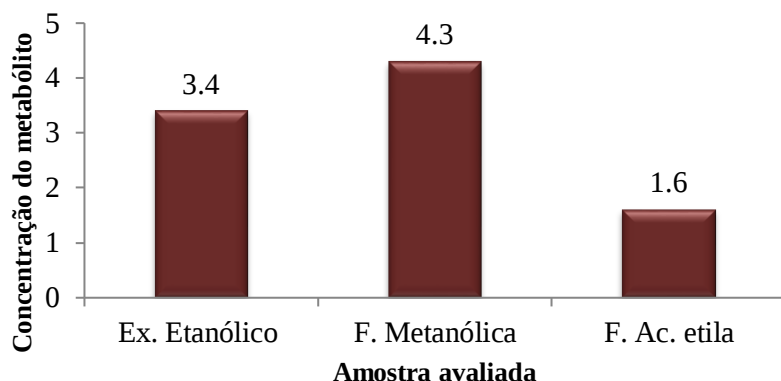


Figura 4: Concentração de flavonoides em mg EqQ/g de amostra para o extrato etanólico e frações.

Fonte: Autoria própria.

Os dados encontrados nesta pesquisa mostram-se promissores, pois encontram-se dentro da média dos já descritos na literatura, visto que, em uma análise feita por (Abdel-Shafi et al. (2019) do extrato etanólico dos cálices do *H. sabdariffa* L. foi observado uma concentração de fenóis totais de 20,0 mg EqAG/g e flavonoides de 4,3 mg EqQ/g, já em um estudo fitoquímico realizado por Das (2014) os valores para este mesmo tipo de extrato foram de $34,0 \pm 5$ mg EqAG/g e $27,56 \pm 1,52$ mg EqQ/g.

As curvas analíticas obtidas, utilizando o padrão ácido gálico (fenóis totais) e quercetina (flavonoides), pelo método dos mínimos quadrados, apresentaram equação de $y =$

$0,0723x + 0,0241$ com coeficiente de correlação de 0,9965 e $y = 0,0802x + 0,0216$ com coeficiente de correlação de 0,9995, respectivamente, indicando a linearidade do método dentro da faixa de concentração estudada. Estas também se mostram de acordo com o valor mínimo aceitável para o coeficiente de correlação ($r = 0,990$), que é indicado na Resolução para Validação de Métodos Analíticos da ANVISA (JUNIOR et al., 2019).

A linearidade do método e a significância estatística da curva ainda foi testada pela análise da variância (ANOVA), em que para o teste do ajuste obteve-se um $F_{\text{calculado}} 2,15 < F_{\text{tabelado}} 3,708$ para a primeira curva e $F_{\text{calculado}} 2,96 < F_{\text{tabelado}} 3,259$ para a segunda, indicando que não há evidência de falta de ajuste, assim como para teste da significância da regressão, em que o $F_{\text{calculado}}$ (1843,32 e 17059,22, respectivamente) foi bem maior que o F_{tabelado} (4,667 e 4,494, respectivamente), demonstrando que o método é linear a um nível de significância de 95%.

A atividade antioxidante realizada pelos métodos de captura do radical DPPH e ABTS pode ser observada na Tabela 2, os resultados foram expressos em CE_{50} , desta forma quanto menor o valor do CE_{50} , maior a atividade antioxidante do extrato. Dentre as amostras analisadas, a fração metanólica demonstrou ter a maior atividade antioxidante para as duas metodologias aplicadas, com um valor de CE_{50} de 88,811 $\mu\text{g/mL}$ (DPPH) e 60,04 $\mu\text{g/mL}$ (ABTS), o que pode ser correlacionado com os resultados obtidos para fenóis totais e flavonoides, que estão em maior concentração nesta mesma fração e que são diretamente associados à atividade antioxidante da planta. Os coeficientes de correlação descritos na tabela 2, obtidos pelo modelo de regressão linear simples teve seus valores próximos a 1 em todas as amostras e em ambos os métodos, o que indica a relação linear entre a concentração do extrato ou fração e a atividade antioxidante.

Tabela 2: CE_{50} para atividade antioxidante pelos métodos de captura do DPPH e ABTS, com seus respectivos coeficientes de correlação (r).

AMOSTRAS	DPPH – CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	r	ABTS – CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	r
Ácido gálico	$0,853 \pm 0,017$	0,961	$0,660 \pm 0,011$	0,986
Ex. Etanólico	$122,726 \pm 1,887$	0,995	$101,140 \pm 6,225$	0,989
F. Metanólica	$88,811 \pm 1,096$	0,990	$60,041 \pm 1,168$	0,996
F. Acetato	$158,825 \pm 5,513$	0,993	$151,941 \pm 4,708$	0,998

Fonte: Autoria própria.

Ao comparar os valores de CE_{50} para atividade antioxidante encontrados nesta pesquisa com os dados presentes na literatura, constata-se que estes encontram-se dentro da média do que é esperado para esta espécie, visto que em uma análise realizada por Widowati et al. (2017) do extrato hidroetanólico (etanol 70%) obtido a partir dos cálices do *H. sabdariffa* L., foi observado que a concentração média que inibia 50% do radical no meio foi de $195.73 \pm 18.63 \mu\text{g/mL}$ (DPPH) e de $74.58 \pm 2.97 \mu\text{g/mL}$ (ABTS). Em relação ao extrato metanólico, uma pesquisa realizada recentemente por Silva et al. (2019) verificou um valor de $CE_{50} = 20,38 \mu\text{g/mL}$, pelo método de captura do radical DPPH.

A diferença estatística entre as duas metodologias empregadas (DPPH e ABTS) foi verificada pela aplicação do teste F para comparação da precisão entre os métodos, seguido pelo teste T de Student aplicado para verificar a diferença entre as médias de dois conjuntos de dados, os resultados para esta análise podem ser observados na Tabela 3, em que os valores de $F_{\text{calculado}}$ foram menores que os de F_{tabelado} para todas as amostras, evidenciando a ausência de diferença significativa entre as precisões das duas metodologias a um nível de confiança de 95%. Em relação ao teste T, foi possível observar o $T_{\text{calculado}}$ menor que o T_{tabelado} apenas no extrato etanólico e fração acetato, o que indica que não há diferença estatística entre as médias desses dois conjuntos de dados a um nível de confiança de 95%. Em contrapartida as médias se mostraram significativamente divergentes para as amostras de ácido gálico e fração metanólica ao mesmo nível de confiança, indicando que para estas, as metodologias utilizadas trazem resultados estatisticamente diferentes.

Tabela 3: Análise da diferença estatística das metodologias empregadas para avaliar a atividade antioxidante.

AMOSTRAS	Teste F – $F_{\text{calculado}}$	Teste T – $T_{\text{calculado}}$	Valores tabelados (n=1=2; P = 5%)
Ácido gálico	2,684	10,971	$F_{\text{tabelado}} = 19,00$
Ex. Etanólico	10,878	3,832	
F. Metanólica	1,137	20,754	$T_{\text{tabelado}} = 4,30$
F. Acetato	1,371	1,097	

Fonte: Autoria própria.

Os resultados discordantes citados acima podem estar relacionados à maior atividade e estrutura química dos agentes antioxidantes presentes nestas amostras, visto que, quando estes

são parcialmente oxidados reações secundárias podem ocorrer, influenciando na quantidade de elétrons trocados durante a reação com o radical utilizado (ABRAMOVIC, et al., 2018). Tal diferença também pode ser explicada pela capacidade que os radicais possuem em reagir com as diversas substâncias antioxidantes presentes na amostra, em que o DPPH reage apenas com aquelas mais reativas, fazendo com que as moléculas de menor reatividade não sejam detectadas por este método, enquanto que no ensaio utilizando o radical ABTS é possível verificar a presença de substância tanto de maior reatividade, quanto as intermediárias (OLIVEIRA et al., 2014).

Os métodos DPPH e ABTS são amplamente utilizados na avaliação da atividade antioxidante de extratos de plantas, os dois têm como base a redução do radical por substâncias antioxidantes da amostra, mecanismo que pode ser observado nas Figuras 3 (DPPH) e 4 (ABTS), tal reação leva a alteração na coloração do meio que pode ser medida espectrofotometricamente. Contudo algumas diferenças entre essas duas metodologias são relatadas na literatura, como a vantagem da aplicação do método ABTS na análise de substância coloridas, visto que a medição de sua absorbância é feita fora da faixa espectral do visível (OLIVEIRA et al., 2014; SHALABY; SHANAB, 2013). Outros fatores também favoráveis a utilização deste método é que o mesmo pode ser aplicado em meios constituídos por solventes orgânicos ou aquosos, tornando-o adequado a análise de substância lipofílicas e hidrofílicas, além de também poder ser utilizado em amostras com diferentes níveis de pH, enquanto que o método do radical DPPH é sensível apenas em meio ácido (SHALABY; SHANAB, 2013).

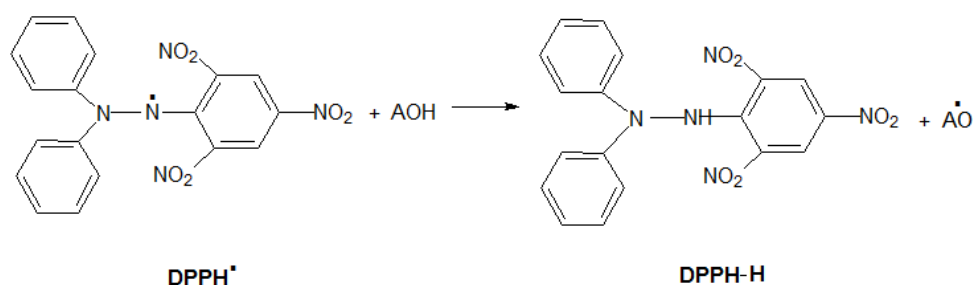


Figura 5: Representação da reação do radical DPPH• com uma espécie antioxidante (AOH), na qual este sofre redução após receber elétrons/hidrogênio.

Fonte: Adaptado de Oliveira et al. (2014)

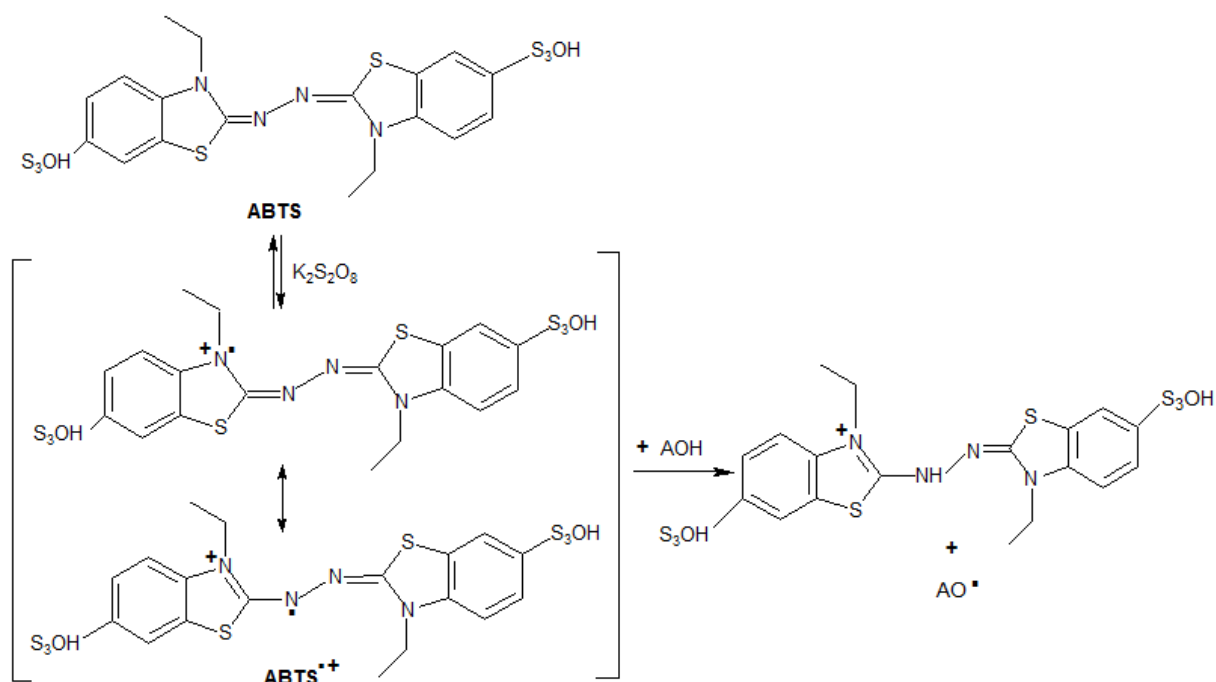


Figura 6: Representação do mecanismo de geração do radical $ABTS^{\bullet+}$ a partir do seu precursor, ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico (ABTS), ao reagir com persulfato de potássio e, subsequente reação do radical formado com a espécie antioxidante (AOH), com redução e estabilização do mesmo após transferência de elétrons/hidrogênio.

Fonte: Adaptado de Oliveira et al. (2014).

Os resultados referentes à atividade antibacteriana do extrato etanólico do *Hibiscus sabdariffa* L. contra cepas de *S. aureus* podem ser observados na Tabela 4, em que letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa relacionada à concentração do extrato utilizado e o halo formado a um nível de confiança de 95%. As menores concentrações de extrato empregadas, capazes de promover a formação de halo de inibição, foram de 62,5 mg/ml para as cepas 1 e 2, com a formação de halo de $14,9 \pm 0,11$ mm e $17,9 \pm 1,45$ mm, respectivamente. Para a cepa 3, a menor concentração em que ainda foi possível observar a formação de halo ($11,9 \pm 1,80$ mm) foi de 31,25 mg/ml.

Ao avaliar a influência da concentração do extrato na formação do halo de inibição, não foi observado diferença significativa entre as concentrações de 500 e 250 mg/ml e de 250 e 125 mg/ml para cepa 2, nem entre as concentrações de 125 e 62,5 mg/ml para as três cepas, e entre as de 62,5 e 31,25 mg/ml para a cepa 3, assim a utilização de uma ou outra concentração leva a formação de halos estatisticamente similares, a um nível de confiança de 95%.

Os dados relacionados à sensibilidade de cada cepa de *S. aureus* utilizadas no ensaio frente às diferentes concentrações do extrato etanólico do *H. sabdariffa* L. também podem ser observados na Tabela 4, em que na concentração de 125 mg/ml as cepas 1 e 2 mostraram possuir sensibilidade diferente. Para além, a cepa 3 também demonstrou ter sensibilidade significativamente divergente das demais, na concentração de 31,25 mg/ml, a um nível de confiança de 95%. Nas Figuras 7, 8 e 9, é possível observar os halos de inibição que foram formados pelas diferentes concentrações do extrato utilizadas no ensaio.

Tabela 4: Atividade antibacteriana do *H. sabdariffa* L. contra *S. aureus*.

Extrato Etanólico			
Doses mg/ml	Média (mm) ± DP dos halos de inibição		
	Cepa 1	Cepa 2	Cepa 3
500	29,8±0,88 ^a	31,5±2,86 ^a	30,3±3,29 ^a
250	22,5±1,66 ^a	26,3±1,20 ^{ab}	24,7±2,51 ^b
125	17,2±1,80 ^a	21,9±0,28 ^{bc}	18,8±2,72 ^c
62,50	14,9±0,11 ^c	17,9±1,45 ^c	15,2±3,82 ^{cd}
31,25	0,0±0,0 ^d	0,0±0,0 ^d	11,9±1,80 ^d
15,63	0,0±0,0 ^d	0,0±0,0 ^d	0,0±0,0 ^e
7,81	0,0±0,0 ^d	0,0±0,0 ^d	0,0±0,0 ^e
3,91	0,0±0,0 ^d	0,0±0,0 ^d	0,0±0,0 ^e

Fonte: Autoria Própria.

Nota: Letras distintas subscrita na mesma coluna indicam diferença significativa entre as doses utilizadas e a formação de halo de inibição para cada cepa de acordo com o teste de Tukey (α : 0,05). Letras distintas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa na sensibilidade entre as cepas frente a concentração do extrato empregada de acordo com o teste de Tukey (α : 0,05).

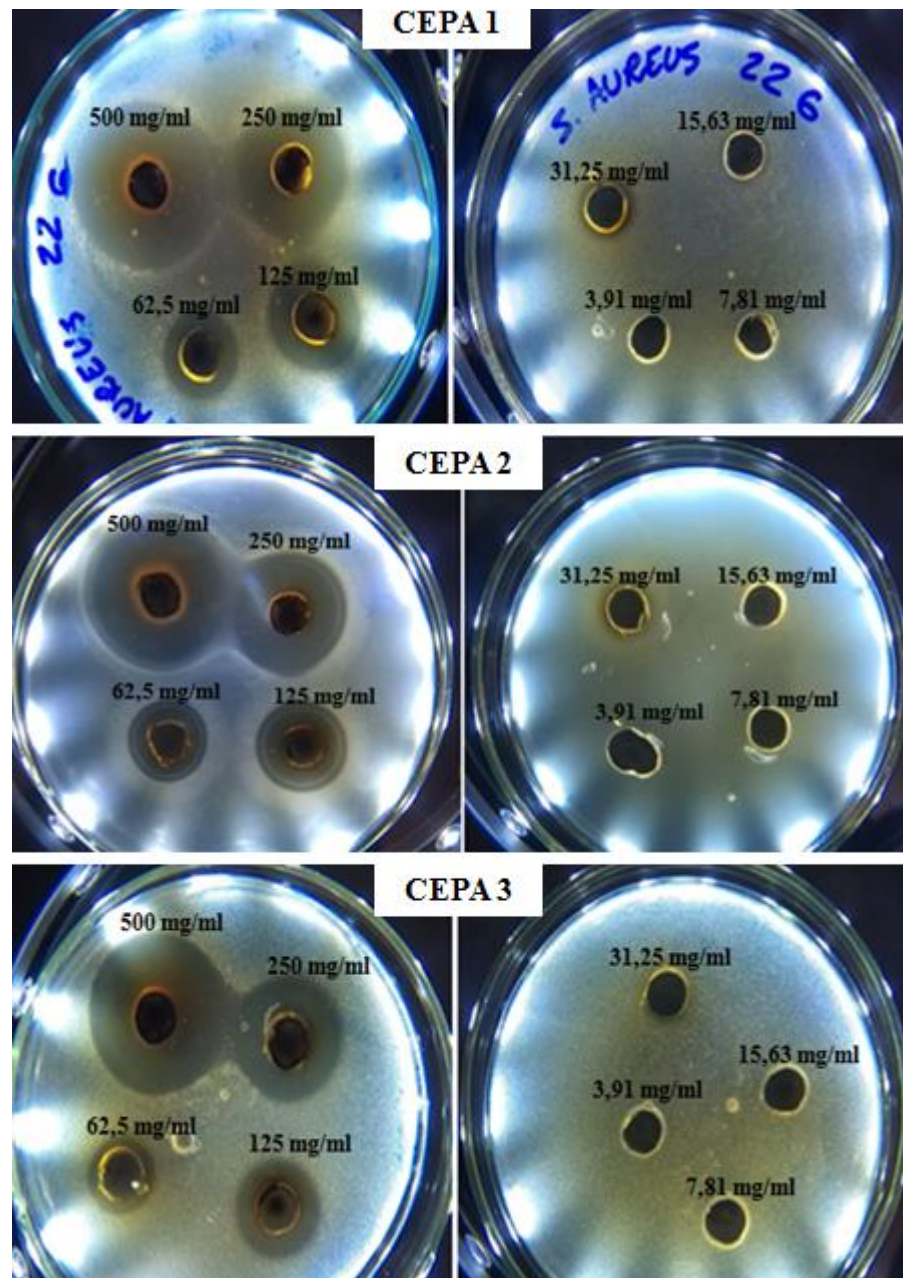


Figura 7: Halos de inibição formados após incubação da cepa 1 (22G), 2 (1SGB) e 3 (11iB) de *S. aureus* com o extrato etanólico de *H. sabdaridda* L.

Fonte: Autoria Própria.

Em um estudo realizado por Gonelimali et al. (2018), em que as propriedades antimicrobianas do extrato aquoso e etanólico de algumas plantas foram analisadas, dentre elas a do *H. sabdariffa* L., resultados comparáveis com os presentes nesta pesquisa foram observados. No primeiro momento foi observada a ação antibacteriana destes extratos na concentração de 20% (p/v), os quais levaram a formação de halos de inibição de $15,7 \pm 1$ mm (aquoso) e $21,5 \pm 2,1$ mm (etanólico) na cultura de *S. aureus*. Para além, foi visto uma relação direta entre essa atividade e a concentração do extrato utilizada, onde foi obtida uma

concentração mínima inibitória (MIC) de 2,5% (p/v) tanto para o extrato aquoso, quanto para o etanólico. Este estudo também relata que a presença de metabólitos, como os compostos fenólicos e seus derivados, atuam em vários alvos do microorganismo, afetando a integridade de sua célula.

Existem poucas referências na literatura em que extratos do *Hibiscus sabdariffa* L. são testados contra cepas de *S. aureus* resistente a metilicina (MRSA) e, as que existem são de longa data, como o estudo realizado por Liu; Tsao; Yin (2005), no qual o extrato aquoso dos cálices do hibiscus apresentou efeito antibacteriano significativo, inibindo o crescimento de cepas MRSA e tendo uma MIC de 32 ± 8 mg/l, sendo considerado um resultado promissor para o uso desta planta como alimento funcional capaz de prevenir infecções.

Os resultados referentes ao ensaio de atividade anti-inflamatória realizada para o extrato etanólico e frações metanólica e acetato de etila podem ser observados na Figura 8, os quais mostraram-se divergentes do que se esperava, visto que, ao comparar a resposta das células não estimuladas com a daquelas que foram estimuladas pelo LPS, tem-se um resultado similar frente a incubação com as diferentes concentrações do extrato etanólico e frações, nesta situação é possível inferir que as concentrações dos extratos utilizadas ao invés de promover uma atividade anti-inflamatória promoveram a morte das células, levando a redução aparente da produção de óxido nítrico. Para além, tal fato pode ser associado à mudança do pH observado quando a cultura de células foi incubada com os extratos, em que o indicador de pH do meio tornou-se amarelo, indicando um pH ácido, incompatível com a sobrevivência de tais células.

Estes resultados que indicam a ocorrência de morte celular também foram notados no ensaio de viabilidade pelo método XTT, mesmo sendo aplicado às amostras apenas nas menores concentrações, como pode ser observado nas Figuras 9.

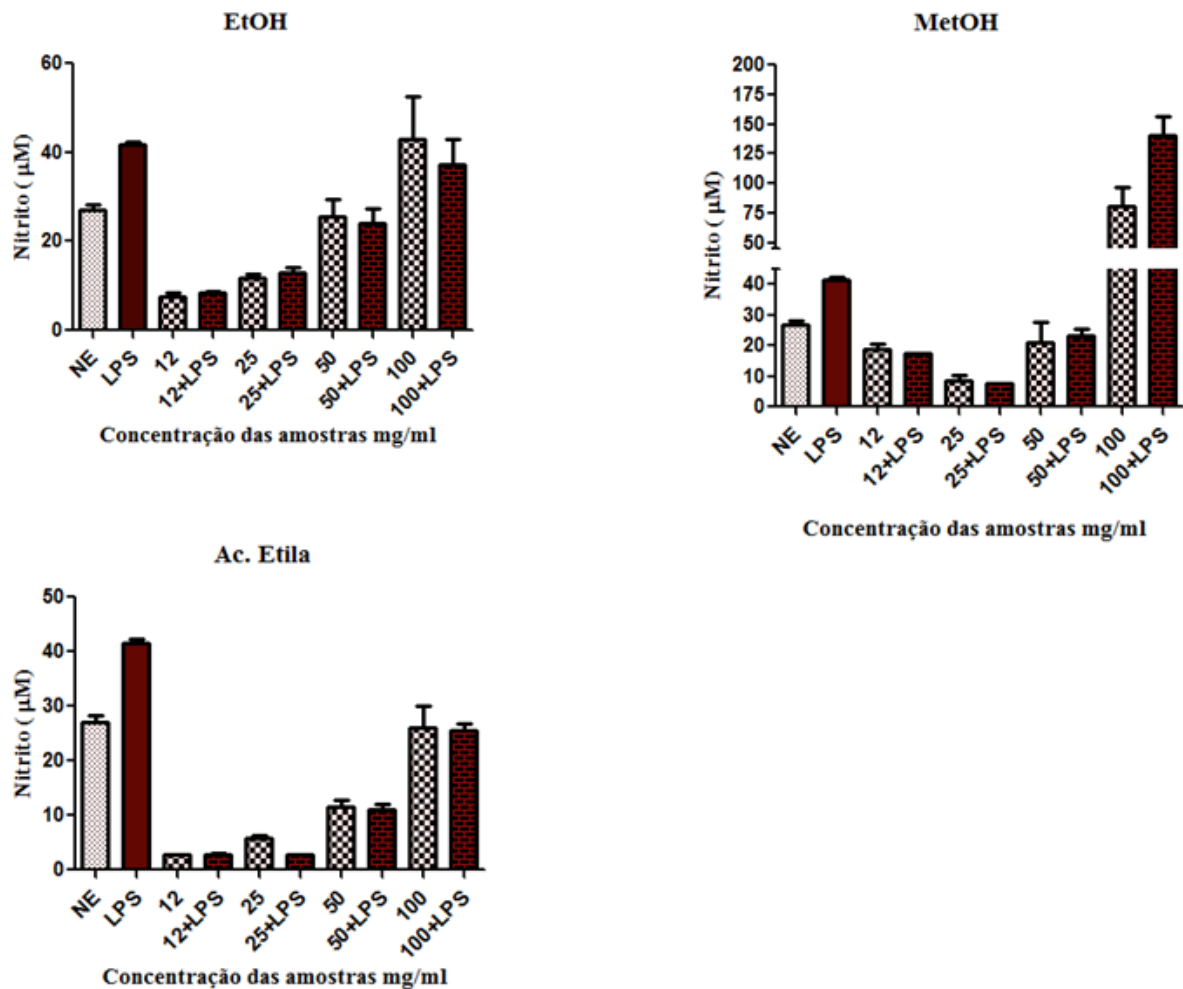


Figura 8: Níveis de nitrito formado a partir do óxido nítrico produzido por células RAW 264.7 induzidas por LPS, após serem incubadas com concentrações seriadas do extrato etanólico e frações. Os dados são representados por média $\pm$ DP (n=3).

Nota¹: NE (não estimulada), LPS (lipopolissacarídeo bacteriano), Ac etila (fração acetato de etila).

Fonte: Autoria própria.

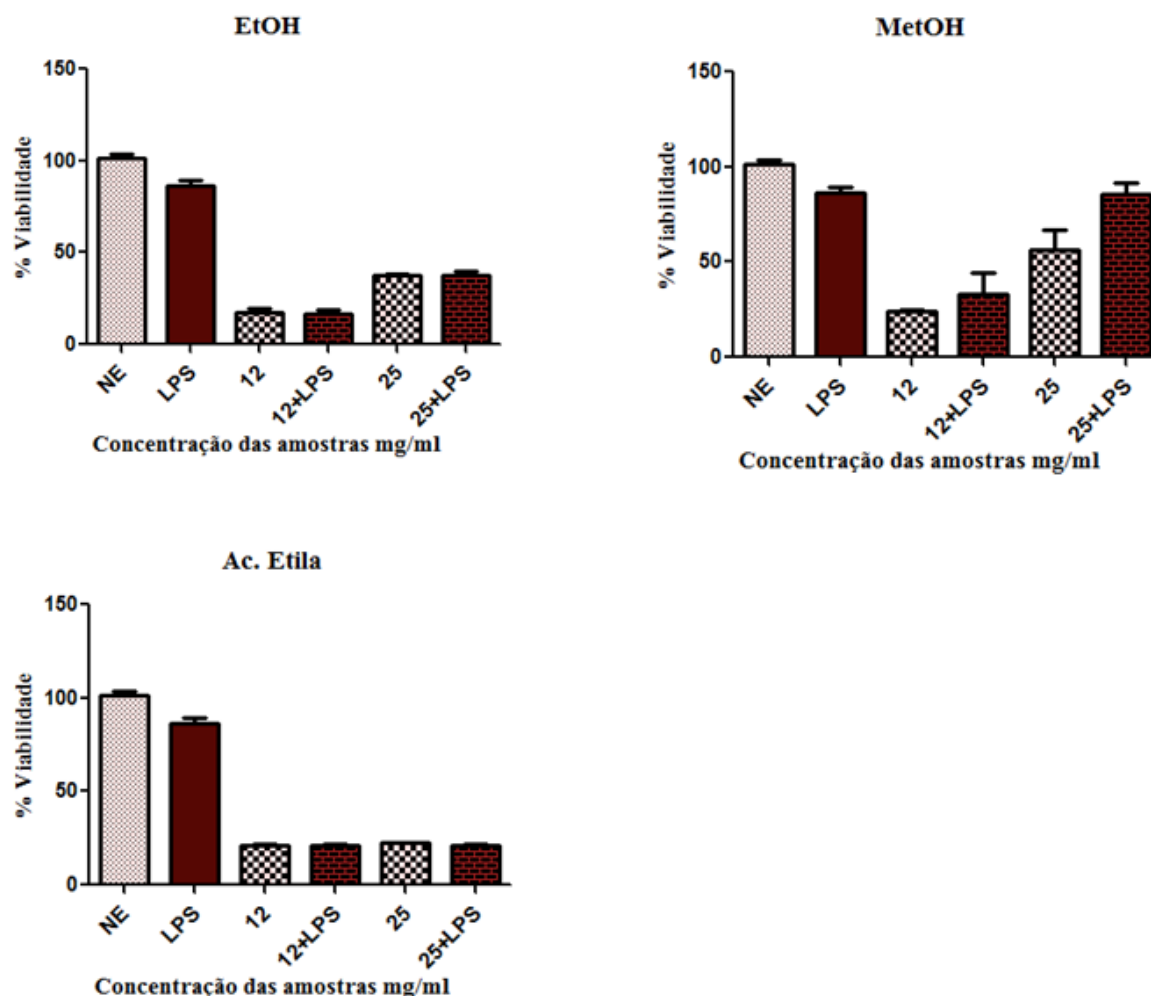


Figura 9: Porcentagem de viabilidade celular pela redução do XTT, após incubação com o extrato etanólico e frações. Os dados são representados por média $\pm$ DP (n=3).

Nota¹: NE (não estimulada), LPS (lipopolissacarídeo bacteriano), Ac. Etila (fração acetato de etila).

Fonte: Autoria própria.

Ademais, não foi possível avaliar com confiabilidade a viabilidade celular nem a atividade anti-inflamatória, pois houve deposição do extrato sobre as células. Por se tratar de um ensaio colorimétrico, tal fato pode ser explicado pela interferência da matriz colorida das amostras na quantificação do analito de interesse, este efeito pode se correlacionar com a concentração, que quanto mais alta, maior tende a ser a interferência (PINHO et al., 2014). Em um ensaio realizado por Zhen et al. (2016), o extrato das folhas do *H. sabdariffa* foi testado nas concentrações de 20 μ g/ml, 40 μ g/ml e 80 μ g/ml, pelo mesmo método aqui empregado, entretanto ao utilizar estas concentrações menores os resultados obtidos foram dose-dependentes para inibição da produção de óxido nítrico, indicando o potencial anti-inflamatório do extrato.

Outro fator que também pode reduzir essas interferências da matriz no ensaio colorimétrico é a análise de substâncias já isoladas, como visto no ensaio realizado por Sogo et al. (2015), em que ao avaliar concentrações de 50 a 200 mM da delphinidina-3-sambubioside isolada dos cálices do *H.sabdariffa*, pôde verificar a redução na produção de óxido nítrico em células RAW 264.7 induzidas por LPS, para além, também foi visto que esta antocianina inibiu a expressão de iNOS e suprimiu a produção dos mediadores inflamatórios TNF- α , IL-6 e MCP-1.

Em relação à avaliação da citotoxicidade empregando amostras mais diluídas, resultados favoráveis foram observados por Garbi et al. (2016), que ao avaliar o extrato metanólico dos cálices do hibiscus pelo ensaio MTT (similar ao XTT) utilizando concentrações de 500, 250 e 125 $\mu\text{g/ml}$, verificou uma $\text{IC}_{50} > 100 \mu\text{g/ml}$.

6 PRINCIPAIS RESULTADOS

- Fitoquímica qualitativa positiva para fenóis totais, flavonóides, triterpenos e esteróides;
- Fitoquímica quantitativa: Maior teor de fenóis totais e flavonóides para a fração metanólica, seguido do extrato bruto etanólico e fração acetato de etila;
- Atividade antioxidante: A fração metanólica demonstrou possuir menor CE_{50} dentre as demais amostras e consequentemente maior atividade antioxidante;
- O extrato bruto etanólico apresentou ação antibacteriana frente a cepas de *S. aureus* resistente a metilicina de maneira proporcional a dose;
- As concentrações do extrato que demonstram possuir atividade antibacteriana mostraram-se citotóxicas;
- O dados obtidos pelo ensaio de atividade anti-inflamatória não puderam ser avaliados com confiabilidade, em vista da interferência da matriz.

7 CONCLUSÃO

O extrato etanólico e frações (metanólica e acetato de etila) obtidos a partir dos cálices do *H. sabdariffa* L. demonstraram possuir riqueza em metabólitos secundários que são associados à atividade antibacteriana e anti-inflamatória. Conquanto, apesar do extrato etanólico ter demonstrado uma promissora ação antibacteriana contra cepas de *S. aureus* multirresistente, seu emprego para este fim deve ser cuidadoso, limitando-se ao uso como antibacteriano ambiental (sanitizante), visto que as concentrações que demonstraram possuir tal atividade mostraram-se citotóxicas.

Uma análise mais detalhada a respeito da atividade anti-inflamatória deve ser considerada, visto que muitos estudos demonstraram que o hibiscus porta tais ações, quando avaliado em amostras menos concentradas ou com seus metabólitos isolados, evitando desta forma a interferência da coloração do extrato. Para além, mais ensaios também devem ser realizados referentes à investigação mais detalhada da citotoxicidade do *H. sabdariffa*, empregando também amostras mais diluídas, associando-as com as concentrações em que se observa atividade anti-inflamatória, para então se avaliar o uso do hibiscus de forma medicinal para este fim.

8 REFERÊNCIAS

- ABDALLAH, E. M. Antibacterial activity of Hibiscus sabdariffa L. calyces against hospital isolates of multidrug resistant Acinetobacter baumannii. **Journal of Acute Disease**, v. 5, n. 6, p. 512–516, 2016a.
- ABDALLAH, E. M. Antibacterial efficiency of the Sudanese Roselle (Hibiscus sabdariffa L.), a famous beverage from Sudanese folk medicine. **Journal of Intercultural Ethnopharmacology**, v. 5, n. 2, p. 186–190, 2016b.
- ABDEL-SHAFI, S. et al. Antimicrobial Activity and Chemical Constitution of the Crude, Phenolic-Rich Extracts of Hibiscus sabdariffa, Brassica oleracea and Beta vulgaris. **Molecules**, v. 24, n. 23, p. 4280, 2019.
- ABRAMOVIC, H. et al. Relevance and Standardization of In Vitro Antioxidant Assays : ABTS , DPPH , and Folin – Ciocalteu. **Journal of Chemistry**, v. 2, n. 6, p. 9, 2018.
- ARAUJO, R. J. B. L.; MACENA, I. D.; SARMENTO, M. C. Hibiscus sabdariffa L . e seus benefícios funcionais a saúde humana com ênfase no Chá de Hibiscos. In: II Congresso Brasileiro de Ciências da Saúde, 2017, Campina Grande. **Anais**. Campina Grande: Realize Editora, 2017.
- BASTOS, M. R. **Proposição de Sequência Didática Sobre a Formação de Biofilme Bacteriano e sua Interferência na Saúde Humana**. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2017.
- BORRÁS-LINARES, I. et al. Characterization of phenolic compounds , anthocyanidin , antioxidant and antimicrobial activity of 25 varieties of Mexican Roselle (Hibiscus sabdariffa). **Industrial Crops & Products**, v. 69, p. 385–394, 2015.
- BOSCARIOL, R.; OUCHI, J. D.; PEREIRA, G. Produção de Biofilme por *Staphylococcus aureus*. **Revista Saúde em Foco**, ed. 10, p. 11–16, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica**. 1.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 156 p. (Série A. Normas e Manuais Técnicos).
- CAMPOS, S. C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 1, p. 373–382, 2016.

CHEN, L. et al. Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. **Oncotarget**, v. 9, n. 6, p. 7204–7218, 2018.

COELHO, C. A.; AMORIM, B. S. Expandindo a distribuição geográfica de *Hibiscus sabdariffa* L. (Malvaceae): uma espécie naturalizada e negligenciada para a flora brasileira. **Hoehnea**, v. 46, n. 1, p. 1–7, 2019.

CORREIA, S. et al. Mechanisms of quinolone action and resistance: where do we stand? **Journal of Medical Microbiology**, v. 66, n. 5, p. 551–559, 2017.

DA-COSTA-ROCHA, I. et al. *Hibiscus sabdariffa* L. - a phytochemical and pharmacological Review. **FOOD CHEMISTRY**, v. 165, p. 424–443, 2014.

DAS, S. In Vitro Evaluation of Phytochemical, Antimicrobial and Antioxidant Activity of Calyces of Roselle (*Hibiscus Sabdariffa* L.). **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 5, n. 8, p. 3364–3369, 2014.

EMBRAPA. **Hortaliças não convencionais. Hortaliças tradicionais: vinagreira**. Brasília, DF: Embrapa Hortaliças, 2017. Disponível em:
<<http://www.bdpa.cnptia.embrapa.br/consulta/busca?b=ad&id=1071384&biblioteca=vazio&busca=1071384&qFacets=1071384&sort=&paginacao=t&paginaAtual=1>> Acesso em: 30, set. 2020.

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, n. 4, p. 529–539, 2014.

FAGUNDES, G. E.; MASSUNAGA, N. Ações terapêuticas da planta *Hibiscus acetosella* Welw. ex Hiern. **Revista Brasileira de Nutrição Funcional**, v. 15, n. 65, p. 13–18, 2016.

FAUZIYAH, P. N.; SUKANDAR, E. Y.; AYUNINGTYAS, D. K. Combination Effect of Antituberculosis Drugs and Ethanolic Extract of Selected Medicinal Plants against Multi-Drug Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Isolates. **Scientia Pharmaceutica**, v. 85, n. 14, p. 1–9, 2017.

FIGUEREDO, C. A. DE; GURGEL, I. G. D.; JUNIOR, G. D. G. A política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos: Construção, perspectivas e desafios. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 381–400, 2014.

FREITAS, F. A. et al. EXOTOXINAS ESTAFILOCÓCICAS E SUA IMPORTÂNCIA NA MASTITE BOVINA. **Enciclopédia Biosfera**, v. 10, n. 18, p. 1685–1705, 2014.

GADELHA, C. S. et al. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 5, p. 208–212, 2013.

GARBI, M. et al. Antibacterial activity, phytochemical screening and cytotoxicity of Hibiscus sabdariffa (calyx). **Adv Med Plant Res**, v. 4, n. 4, p. 116–121, 2016.

GARCIA, P. G.; SILVA, I. A. R. DA; OLIVEIRA, L. R. G. DE. Colonização por staphylococcus aureus resistente à meticilina em pacientes de unidades de terapia intensiva. **Revista Médica de Minas Gerais**, v. 29, n. e-2016, p. 1–5, 2019.

GARG, A. et al. Analysis of triterpenes and triterpenoids. In: **Recent Advances in Natural Products Analysis**. 1. ed. [s.l]. Elsevier, 2020. p. 393–426.

GERMOLEC, D. R. et al. Markers of inflammation. In: **Methods in Molecular Biology**. [s.l.]: Springer, 2018. v. 1803, p. 57–79.

GHOSH, S. Biosynthesis of structurally diverse triterpenes in plants: The role of oxidosqualene cyclases. **Proceedings of the Indian National Science Academy**, v. 82, n. 4, p. 1189–1210, 2016.

GHOSH, S. Triterpene structural diversification by plant cytochrome P450 enzymes. **Frontiers in Plant Science**, v. 8, n. 4, p. 1–15, 2017.

GONELIMALI, F. D. et al. Antimicrobial properties and mechanism of action of some plant extracts against food pathogens and spoilage microorganisms. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, n. 1639, 2018.

GOUAL, L.; FIROOZABADI, A. Measuring Asphaltenes and Resins , and Dipole Moment in Petroleum Fluids. **American Institute of Chemical Engineers journal**, v. 48, n. 11, p. 2646–2663, 2002.

GRAF, A. C. et al. Virulence factors produced by staphylococcus aureus biofilms have a moonlighting function contributing to biofilm integrity. **Molecular and Cellular Proteomics**, v. 18, n. 6, p. 1036–1053, 2019.

GÜL, A. Dynamics of inflammatory response in autoinflammatory disorders: Autonomous and hyperinflammatory states. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. 2422, 2018.

HAYATI, Z. et al. Anti-bacterial Activity of Rosella Flowers Extract (Hibiscus Sabdariffa Linn) in Inhibiting Bacterial Growth Methicillin-resistant Staphylococcus Aureus. In: 2nd Syiah Kuala University Annual International Conference, 2012, Banda Aceh, Indonésia. **Anais...** Banda Aceh, Indonésia: Life Sciences & Engineering Chapter, 8. ed. 2012. p. 416-4420.

HENDERSON, A.; NIMMO, G. R. Control of healthcare- and community-associated MRSA: Recent progress and persisting challenges. **British Medical Bulletin**, v. 125, n. 1, p. 25–41, 2018.

JUNIOR, E. J. A. G. et al. Validação de Método Espectrofotométrico de Análise para a Quantificação de Ácido Acetilsalicílico em Formulações Farmacêuticas: Uma Proposta de Aula Experimental para Análise Instrumental. **Química Nova**, v. 42, n. 1, p. 99–104, 2019.

KANE, T. L.; CAROTHERS, K. E.; LEE, S. W. Virulence Factor Targeting of the Bacterial Pathogen Staphylococcus aureus for Vaccine and Therapeutics. **Current Drug Targets**, v. 19, n. 2, p. 111–127, 2018.

KHALAPHALLAH, R.; SOLIMAN, W. S. E ffect of henna and roselle extracts on pathogenic bacteria. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease journal**, v. 4, n. 4, p. 292–296, 2014.

KONG, C.; NEOH, H. M.; NATHAN, S. Targeting Staphylococcus aureus toxins: A potential form of anti-virulence therapy. **Toxins**, v. 8, n. 3, p. 1–21, 2016.

LIMA, M. V. DA 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. **Multitemas**, v. 23, n. 55, p. 121–132, 2018.

LIU, K.; TSAO, S.; YIN, M. In vitro Antibacterial Activity of Roselle Calyx and Protocatechuic Acid. **Phytotherapy Research**, v. 19, n. 11, p. 942–945, 2005.

LOUREIRO, J. R. et al. O uso de antibióticos e as resistências bacterianas : breves notas sobre a sua evolução. **Revista Portuguesa de Saúde Pública**, v. 4, n. 1, p. 77–84, 2016.

LUSIDA, T. T. E.; HERMANTO, B.; SUDARNO. The Antibacterial Effect of Roselle

(*Hibiscus Sabdariffa*) Extract Against *Staphylococcus Epidermidis* In Vitro. **Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease**, v. 6, n. 4, p. 88–91, 2017.

MARMITT, D. J. et al. Plantas com Potencial Antibacteriano da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse do Sistema Único de Saúde: Revisão Sistemática Resumo. **Revista de Saúde Pública de Santa Catarina**, v. 8, n. 2, p. 135–151, 2015.

MARTÍNEZ MEDINA, R. M. et al. Prevalencia y caracterización genotípica de cepas de *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina aisladas en un hospital regional mexicano. **Revista Chilena de Infectología**, v. 37, n. 1, p. 37–44, 2020.

MARTINS, C. R.; LOPES, W. A.; ANDRADE, J. B. Solubilidade das Substâncias Orgânicas. **Química Nova**, v. 36, n. 8, p. 1248–1255, 2013.

MATOS, F. J. DE A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 3. ed. Fortaleza: EdUFC, 2009.

MENSAH, J. K.; GOLOMEKE, D. Antioxidant and antimicrobial activities of the extracts of the Calyx of *Hibiscus Sabdariffa* Linn. **Current Science Perspectives**, v. 1, n. 2, p. 69–76, 2015.

NABAVIA, S. M. et al. Flavonoid biosynthetic pathways in plants : Versatile targets for metabolic engineering. **Biotechnology Advances**, v. 38, p. 107316, 2020.

NITHYA, V. et al. A ten year study of prevalence, antimicrobial susceptibility pattern, and genotypic characterization of Methicillin resistant *Staphylococcus aureus* causing ocular infections in a tertiary eye care hospital in South India. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 69, p. 203–210, 2019.

O’GARA, J. P. Into the storm: Chasing the opportunistic pathogen *Staphylococcus aureus* from skin colonisation to life-threatening infections. **Environmental Microbiology**, v. 19, n. 10, p. 3823–3833, 2017.

OLIVEIRA, A. C. DE et al. Avaliação do Crescimento de Biofilme de *Staphylococcus Aureus* , In Vitro , em Lúmen de Cateteres de Poliuretano. **Revista Inivasp**, v. 24, n. 46, p. 74–83, 2018.

OLIVEIRA, S. DE et al. Evaluation of Antiradical Assays Used in Determining the Antioxidant Capacity of Pure Compounds and Plant Extracts. **Quim. Nova**, v. 37, n. 3, p.

497–503, 2014.

OPPERMANN, A. M. et al. Determinação de compostos fenólicos totais e flavonoides em extrato e frações Própolis Verde. In: IV Congresso de Ciência e Tecnologia da UTFPR - DV, Dois Vizinhos-PR, 2017. **Anais...** Dois Vizinhos-PR , 2017, p. 412-414.

OSPINA, D. L. A. F. et al. Actividad antiinflamatoria , antioxidante y antibacteriana de dos especies del género *Tabebuia* Antiinflammatory , antioxidant and antibacterial activity of two species of *Tabebuia* genus. **Revista Cubana de Plantas Medicinales.**, v. 18, n. 1, p. 34–46, 2013.

PAPENFORT, K.; BASSLER, B. L. Quorum sensing signal-response systems in Gram-negative bacteria. **Nature Reviews Microbiology**, v. 14, n. 9, p. 576–588, 2016.

PATRICIO, P.; PAIVA, J. A.; BORREGO, L. M. Immune response in bacterial and *Candida* sepsis . **European Journal of Microbiology and Immunology**, v. 9, n. 4, p. 105–113, 2019.

PINHO, G. P. et al. A new spectrophotometric method for determining the enzymatic activity of endo- β -mannanase in seeds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 25, n. 7, p. 1246–1252, 2014.

PIRES, J. et al. **Ensaio em microplaca do potencial antioxidante através do método de sequestro do radical livre DPPH para extratos de algas**. São Paulo: EdUSP, 2017.

RIAZ, G.; CHOPRA, R. A review on phytochemistry and therapeutic uses of *Hibiscus sabdariffa* L. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 102, p. 575–586, 2018.

RIBEIRO, L. H. L. Análise dos programas de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (SUS) sob a perspectiva territorial. **Ciencia & saude coletiva**, v. 24, n. 5, p. 1733–1742, 2019.

ROCHA, L. S. S. et al. Análise da toxicidade de infusões de chás de emagrecimento através do teste *Allium cepa*. **Revista Biotecnologia & Ciência**, v. 6, n. 1, p. 55–62, 2017.

RODRIGUES, T. D. A. et al. A valorização das plantas medicinais como alternativa à saúde: um estudo etnobotânico. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 11, n. 1, p. 411–428, 2020.

SEILIE, E. S.; WARDENBURG, J. B. *Staphylococcus aureus* pore-forming toxins: The

interface of pathogen and host complexity. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 72, p. 101–116, 2017.

SHALABY, E. A.; SHANAB, S. M. M. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. **Indian Journal of Marine Sciences**, v. 42, n. 5, p. 556–564, 2013.

SHEN, C.-Y. et al. Anti-inflammatory activities of essential oil isolated from the calyx of *Hibiscus sabdariffa* L. **Food & Function**, v. 7, n. 10, p. 4451–4459, 2016.

SID-ORTEGA, S.; GUERRERO-BELTRÁN, J. A. Propiedades funcionales de la jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.). **Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos**, v. 2, p. 47–63, 2012.

SILVA, A. B. Ação Cicatrizante e Atividade Antibacteriana a Estirpes de *Staphylococcus* Resistentes do Extrato Etanólico de *Psidium Guajava*. 77 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal Tropical) - Universidade Federal Rural de Pernambuco. Recife, 2016.

SILVA, N. L. et al. Avaliação da Atividade Antioxidante e Antibacteriana do Extrato da Flor de *Hibiscus Sabdariffa* e *Hibiscus Rosa-Sinensis*. **Conexão Ciência**, v. 14, n. 31, p. 14–20, 2019.

SISTEMA NACIONAL DE INFORMAÇÕES TÓXICO-FARMACOLÓGICAS. **Registros de Intoxicações/ dados nacionais/ 2018**. Disponível em: <
<https://sinitox.icict.fiocruz.br/tabela-2-casos-de-intoxica%C3%A7%C3%A3o-por-plantas-por-unidade-federada-segundo-faixa-et%C3%A1ria-registrado-em-2> > Acesso em: 27, maio. 2020.

SOBRINHO, A. C. G.; SANTOS, A. S. Estado da arte: *Hibiscus sabdariffa* Linn, aspectos químicos, farmacológicos e novas perspectivas de abordagens. **Revista Científica Multidisciplinar Núcleo do Conhecimento**, v. 5, n. 1, p. 21–40, 2020.

SOGO, T. et al. Anti-inflammatory activity and molecular mechanism of delphinidin 3-sambubioside, a *Hibiscus anthocyanin*. **Biofatores**, v. 41, n. 1, p. 58–65, 2015.

SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.

SUBHASWARAJ, P. et al. Determination of antioxidant activity of *Hibiscus sabdariffa* and

Croton caudatus in Saccharomyces cerevisiae model system. **Journal of Food Science and Technology**, v. 54, n. 9, p. 2728–2736, 2017.

TEIXEIRA, B. C. et al. Marcadores inflamatórios , função endotelial e riscos cardiovasculares. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 13, n. 2, p. 108–115, 2013.

THOMFORD, N. E. et al. Natural products for drug discovery in the 21st century: Innovations for novel drug discovery. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 6, p. 1578, 2018.

TIMOTHY, T. E. L.; HERMANTO, B.; SUDARNO. The Antibacterial Effect Of Roselle (Hibiscus Sabdariffa) Extract Against Staphylococcus Epidermidis In Vitro. **Indonesian Journal of Tropical and Infectious Disease**, v. 6, n. 4, p. 88–91, 2017.

TITTONA, N. F.; SCHUMACHERB, A. B.; DANI, C. Estudo comparativo da quantidade de polifenóis totais e da atividade antioxidante em diferentes chocolates: ao leite, meio amargo, amargo e de soja. **Ciência em Movimento**, v. 2, n. 33, 2014.

TORRES, P. B. et al. **Ensaio do potencial antioxidante de extratos de algas através do sequestro do ABTS • + em microplaca**. São Paulo: EdUSP, 2017.

VANDENESCH, F.; LINA, G.; HENRY, T. Staphylococcus aureus hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors? **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. 12, p. 1–15, 2012.

VESTERGAARD, M.; FREES, D.; INGMER, H. Antibiotic Resistance and the MRSA Problem. **Microbiology Spectrum**, v. 7, n. 2, 2019.

WIDOWATI, W. et al. Antioxidant and antiaging assays of Hibiscus sabdariffa extract and its compounds. **Natural Product Sciences**, v. 23, n. 3, p. 192–200, 2017.

ZHEN, J. et al. Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of Hibiscus sabdariffa leaves. **Food Chemistry**, v. 190, p. 673–680, 2016.