

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DA
GOSSYPIUM HIRSUTUM L. CONTRA PSEUDOMONAS AERUGINOSA**

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT OF *GOSSYPIUM
HIRSUTUM L.* AGAINST *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*.

LETÍCIA ATAÍDE **DELGADO**. Acadêmica do curso de graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

DANIELE DE SOUZA **SIQUEIRA**. Acadêmica do curso de graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

JOSÉ LUCAS SOARES **FERREIRA**. Acadêmico do curso de graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

JOYCE NATIELLE MIRANDA **CAVALCANTE**. Acadêmica do curso de graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

REBECA CÍCERA MENDES DE OLIVEIRA **SILVA**. Acadêmica do curso de graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

RAFAEL CARTAXO **FILGUEIRA**. Acadêmico do curso de graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

RAQUEL VIEIRA **BEZERRA**. Acadêmica do curso de graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

HELOISA MARA BATISTA FERNANDES DE **OLIVEIRA**. Farmacêutica-Bioquímica do Hospital Universitário Ana Bezerra da Universidade Federal do Rio Grande do Norte.

MARIA DAS GRAÇAS VELOSO **MARINHO**. Professora Doutora da Universidade Federal de Campina Grande.

ABRAHÃO ALVES DE **OLIVEIRA FILHO**. Professor Doutor da Universidade Federal de Campina Grande.

Estrada Patos-Teixeira, Jatobá, Patos-PB, CEP 58700-970, E-mail: abrahao.farm@gmail.com

RESUMO

A busca do conhecimento a cerca de plantas medicinais vem acompanhado a evolução do homem através dos tempos. A evolução das espécies bacterianas e resistência microbiana delas, vem crescendo preocupantemente. A *Gossypium hirsutum L.* é popularmente conhecida como algodoeiro e suas folhas tem sido usadas com diversos fins terapêuticos. O presente estudo objetiva avaliar *in vitro* a ação antibacteriana do extrato da *G. hirsutum L.* contra *Pseudomonas aeruginosa*. Para a avaliação da atividade antibacteriana e

determinação da CIM utilizou-se a técnica de microdiluição em placa de 96 poços. Em uma placa de 96 cavidades, foi adicionado caldo *Mueller Hinton* e o extrato etanólico bruto em estudo nas diferentes concentrações. O ensaio foi realizado em duplicata. As placas foram incubadas a 37°C durante 24-48 horas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração do extrato que inibir o crescimento visível do microorganismo. Após a leitura da CIM, alíquotas de 20 µL foram retiradas de cada poço que não apresentar crescimento bacteriano, e transferidas para poços de uma nova placa, desprovidas de qualquer antimicrobiano. As placas inoculadas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35 °C, e as CBMs são registradas após 48 h. A CBM foi definida como a menor concentração do extrato que resultar em inibição visível do crescimento do micro-organismo. Observou-se que o extrato em estudo apresentou CIM₅₀ de 1024 µg/mL e CBM₅₀ maior que 1024 µg/mL. Diante dos resultados obtidos pode-se afirmar que o extrato possui efeito moderado antibacteriano frente às cepas de *P. aeruginosa*.

PALAVRAS-CHAVE: Fitoterapia. Microbiologia. Farmacologia.

ABSTRACT

The search for knowledge about medicinal plants comes with the evolution of man through time. The evolution of the bacterial species and their microbial resistance, has been growing worryingly. The *Gossypium hirsutum* L. is popularly known as cotton and its leaves have been used for various therapeutic purposes. For the evaluation of the antibacterial activity and determination of MIC, the 96-well plate microdilution technique is used. In a 96-well plate, *Mueller Hinton* broth and the crude ethanolic extract under study at different concentrations. The assay was performed in duplicate. The plates were incubated at 37 ° C for 24-48 hours. The MIC was determined as the lowest concentration of the extract that inhibited the visible growth of the microorganism. After reading the MIC, aliquots of 20 µL were withdrawn from each well that did not show bacterial growth, and transferred to wells of a new plaque, devoid of any antimicrobial. The inoculated plates were aseptically closed and incubated at 35 ° C, and the MBCs were recorded after 48 h. MBC was defined as the lowest extract concentration that results in visible inhibition of microorganism growth. It was observed that the extract under study had MBC₅₀ greater than 1024 µg / mL and MIC of 1024 µg / mL. In view of the obtained results it can be affirmed that the extract has a moderate antibacterial effect against the strains of *P. aeruginosa*.

KEYWORDS: Phytoterapy. Microbiology. Pharmacology.

INTRODUÇÃO

Pseudomonas aeruginosa, bacilo Gram-negativo, aeróbio, não-esporulado, não fermentador de glicose, possui flagelo polar, pertence à família *Pseudomonadaceae* e apresenta-se em forma de bastonetes. Mesmo fazendo parte da microbiota residente, é considerado um importante patógeno humano oportunista, pode ser encontrado na água, no solo, no ambiente bucal de indivíduos hospitalizados. Frequentemente associada a infecções hospitalares,

acometendo, principalmente, pacientes imunossuprimidos (LYCZAK; CANNON; PIER, 2000; LUCENA et al., 2014).

P. aeruginosa apresenta-se resistentes a múltiplos fármacos, há também dificuldades nas opções de fármacos para tratamentos combinados além da necessidade de adesão definitiva dos profissionais de saúde às práticas da higiene das mãos, precauções criteriosas com amostras multirresistentes e uso prudente de antimicrobianos (FERREIRA; LALA, 2010).

Nos últimos anos, a resistência de microrganismos patogênicos tem aumentado devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos. Portanto, ações estão sendo tomadas para reduzir este problema, pois o aumento da resistência tem atraído a atenção da comunidade científica à procura de novas drogas de origem natural ou sintética (NASCIMENTO et al., 2007).

O homem busca há muito tempo na natureza alternativas para a melhora da condição de vida aumentando assim, suas perspectivas de sobrevivência e melhoria de sua saúde. A busca do conhecimento a cerca de plantas medicinais vem acompanhado a evolução do homem através dos tempos (LOPES et al., 2010).

A partir da década de 1980, o interesse pelos fármacos de fontes naturais e extratos vegetais cresceu bastante, impulsionando novas pesquisas, com a finalidade de evidenciar a eficácia da fitoterapia e de desenvolver novos fármacos. Além disso, as plantas medicinais podem fornecer eficientes fármacos, com maior probabilidade de eficácia, menor potencial tóxico, e efeito terapêutico semelhante aos fármacos sintéticos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

O crescimento mundial da fitoterapia entre os programas preventivos e curativos tem estimulado a avaliação dos extratos de plantas para o uso na odontologia com ação anti-bacteriana, anti-inflamatória, anti-hemorrágica e anestésica (AGRA; FREITAS; BARBOSA-FILHO, 2007; SILVA et al., 2006).

Muitas espécies da família Malvaceae estão em estudo, diante do intenso uso da população, podem ser consideradas com grande potencial fitoterápico. Dentre os 250 gêneros e 4200 espécies encontradas nessa família, encontramos aproximadamente 80 gêneros e 400 espécies em solos brasileiros (CARVALHO; GAIAD, 2002).

Gossypium hirsutum L., pertence à família Malvaceae, é um arbusto e subarbusto, de origem naturalizada, não endêmica no Brasil, possui uma ampla distribuição pelo Nordeste, conhecida popularmente por algodoeiro, cultivada principalmente para fornecimento de matéria prima para indústria. No Brasil a literatura etnofarmacológica refere seu uso na forma de chá, preparado com as folhas no tratamento de disenteria, hemorragia uterina e também, o emprego local das folhas como cicatrizante (LORENZI; MATOS, 2002).

MATERIAL E MÉTODOS

Ensaio *in vitro*

Substâncias-teste

O extrato etanólico bruto da *Gossypium hirsutum* L. foi cedido pela professora Dra. Maria das Graças Veloso Marinho da Universidade Federal de Campina Grande. Para a realização dos ensaios farmacológicos, as substâncias foram solubilizadas em DMSO e diluído em água destilada. A

concentração de DMSO (dimetilsulfóxido) utilizada foi inferior a 0,1% v/v. O antimicrobiano utilizado na execução dos testes como controle positivo foi o cloranfenicol, adquirido da Sigma-Aldrich® (São Paulo-SP).

Espécies Bacterianas e Meio de cultura

Foram utilizadas Gram-negativas sendo elas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Pseudomonas aeruginosa* 101, *Pseudomonas aeruginosa* 102 e *Pseudomonas aeruginosa* 104, previamente isoladas, identificadas e acondicionadas no laboratório de Microbiologia da Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas (UACB) do Centro de Saúde e Tecnologia Rural (CSTR) da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG).

Todas as cepas se mantiveram em meio Ágar Mueller Hinton (constituído por: extrato de levedura (DIFCO) 10 g, triptona (DIFCO) 5 g, NaCl (VETEC) 10 g) a uma temperatura de 4 °C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em caldo *Mueller Hinton* (MH) incubados a 35 °C. No estudo da atividade antimicrobiana será utilizado um inóculo bacteriano de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000).

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima é determinada pela técnica de microdiluição em caldo (CLEELAND; SQUIRES, 1991; HADACEK; GREGER, 2000). Foram utilizadas placas de 96 orifícios estéreis e com tampa. Em cada orifício da placa, foi adicionado 100 µL do meio líquido MH duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL do extrato na concentração inicial de 1024 µg/mL (também duplamente concentrado), foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa. E por meio de uma diluição seriada em razão de dois, obteve-se as concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontrou-se a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionará 10 µL do inóculo de aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL das espécies bacterianas nas cavidades, onde cada coluna da placa refere-se a uma cepa de bactéria, especificamente.

Paralelamente, realizou-se o controle positivo com o antibacteriano cloranfenicol. Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo MH duplamente concentrado, 100 µL de água destilada estéril e 10 µL do inóculo de cada espécie. Para verificar a ausência de interferência nos resultados pelos solventes utilizados na preparação da emulsão, no caso o DMSO, foi feito um controle no qual colocou-se nas cavidades 100 µL do caldo duplamente concentrado, 100 µL de DMSO e 10µL da suspensão bacteriana. Um controle de esterilidade do meio também foi realizado, onde colocou-se 200 µL do MH em um orifício sem a suspensão das bactérias.

As placas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35°C por 24 - 48 hs para ser realizada a leitura. A CIM para o extrato e o antibacteriano foi definida como a menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano verificado nos orifícios quando comparado com o crescimento controle. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Depois de ler os resultados da CIM, a determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada; três diluições de 10 µl da CIM, foram inoculado em caldo Mueller-Hinton (100 µl / poço) em placas de microdiluição estéreis e, em seguida, foram incubadas 35-37°C durante 24-48 horas. Então, 20 µL de resazurina foi adicionado. As placas foram incubadas por 24 horas a 35-37 ° C e depois confirmou-se a concentração capaz de inibir o crescimento global de espécies bacterianas, verificado onde não houve coloração do indicador corante (MANN; MARKHAM, 1998; PALOMINO et al., 2002).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio líquido

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) em meio líquido foi determinada para o extrato etanólico bruto da *G. hirsutum L.* nas diferentes concentrações explicitadas na metodologia e determinada pela menor concentração capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano, conforme apresentado na tabela 1. Observou-se que os resultados do extrato para as diversas cepas variaram de 128 a 1024 µg/mL.

Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A Concentração Bactericida Mínima (CBM) foi determinada a partir da menor concentração do extrato que resultou em inibição visível do crescimento do microorganismo. De acordo com a tabela 1, observa-se que nenhuma cepa apresentou valores inferiores à 1024 µg/ml.

Tabela 1: Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) em µg/mL do extrato etanólico bruto da *G. hirsutum L.* contra diferentes cepas de *P. aeruginosa*.

Cepas <i>P. aeruginosa</i>	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
ATCC 9027	128	-
Pa 101	-	-
Pa 102	1024	-
Pa 104	1024	-

(-) Concentrações maiores que 1024 µg/mL, não avaliadas neste estudo

Fonte: os autores.

Extratos de plantas já foram constatados como coadjuvantes em doença periodontal induzida em ratos, por exemplo o extrato da *P. paniculata* atuou como agente modulador da inflamação (SOUSA, 2015). Há várias espécies com função antimicrobiana, anestésico local, anti-viral contra o vírus da herpes, cicatrizante, calmante, analgésica, fungicida, necessidades estas do cotidiano odontológico (DE ASSIS, 2009).

Segundo Sartoratto et al. (2004), os valores entre 50-500 µg/ml tem uma forte atividade, 600-1500 µg/ml tem uma moderada atividade e os valores acima de 1500 µg/ml tem uma fraca atividade antibacteriana. Com isso, o

extrato etanólico da *Gossypium hirsutum* L. apresenta um poder inibitório de crescimento contra *P. aeruginosa*, considerado como moderado, uma vez que apresentou CIM₅₀ (Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 50% das cepas) de 1024 µg/mL.

Conforme Hafidh et al. (2011), para que um composto seja considerado bactericida ou bacteriostático de acordo com a Concentração Bactericida Mínima (CBM), esta deve ser igual ou duas vezes mais que a CIM ou a CBM deve ser maior que duas vezes a CIM, respectivamente. Analisando os resultados da CBM pode-se ver que o extrato da *G. hirsutum* L. não possui atividade bacteriostática contra espécies de *P. aeruginosa*, pois sua CBM₅₀ foi maior que 1024 µg/mL frente às cepas de *P. aeruginosa*.

Encontraram-se resultados negativos para atividade antibacteriana da *Sida rhombifolia*, pertencente a família Malvaceae, a mesma família da *G. hirsutum* L., contra a *P. aeruginosa*, discordando dos resultados obtidos com a *G. hirsutum* L (HAIDA et al., 2007; OBAH; AKERELE; OBASUYI, 2007).

Os dados encontrados neste estudo, foram reforçados, com resultado positivo sobre o extrato metanólico das folhas da *G. hirsutum* L. contra a *P. aeruginosa*, apontando inibição do crescimento das cepas da bactéria (BOUZADA et al., 2009).

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, observamos um potencial antimicrobiano do extrato etanólico bruto da *G. hirsutum* L. contra a *Pseudomonas aeruginosa*, auxiliando futuramente no controle da resistência das bactérias aos antimicrobianos já existentes. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de ação deste extrato.

REFERÊNCIAS

AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 114-140, 2007.

BOUZADA, M. L. M et al. Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. **Pharmaceutical biology**, v. 47, n. 1, p. 44-52, 2009.

CARVALHO, P. E. R.; GAIAD S. 2002. **Agência de Informações Embrapa: Espécies Abóreas Brasileiras**. Malvacea. Disponível em: http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvoreCONT000f. Acesso em: Fevereiro de 2018.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. **Antibiotics in laboratory medicine**, v. 3, p. 739-787, 1991.

DE ASSIS, C. Plantas medicinais na Odontologia. **Revista Brasileira de Odontologia**, v. 66, n. 1, p. 72, 2009.

FERREIRA, H.; LALA, E. R. P. Pseudomonas aeruginosa: Um alerta aos profissionais de saúde. **Revista Panamericana de Infectologia**, v. 12, n. 2, p. 44-50, 2010.

HADACEK, F.; GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical analysis**, v. 11, n. 3, p. 137-147, 2000.

HAFIDH, R. R. et al. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **The open microbiology journal**, v. 5, p. 96, 2011.

HAIDA, K. S. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR**, v. 11, n. 3, p. 185-192, 2007.

LOPES, G. A. D. et al. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). **Revista Ciência em Extensão**, v. 6, n. 2, p. 143-155, 2010.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LUCENA, A. et al. Nosocomial infections with metallo-beta-lactamase-producing Pseudomonas aeruginosa: molecular epidemiology, risk factors, clinical features and outcomes. **Journal of Hospital Infection**, v. 87, n. 4, p. 234-240, 2014.

LYCZAK, J. B.; CANNON, C. L.; PIER, G. B. Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist¹. **Microbes and infection**, v. 2, n. 9, p. 1051-1060, 2000.

MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. **Journal of applied microbiology**, v. 84, n. 4, p. 538-544, 1998.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

OBAH, I. E.; AKERELE, J. O.; OBASUYI, O. Antimicrobial activity of the ethanol extract of the aerial parts of Sida acuta burm. f.(malvaceae). **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 4, p. 809-813, 2007.

PALOMINO, J. C. et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720-2722, 2002.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils

from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275-280, 2004.

SILVA, M. I. G. et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Rev bras farmacogn**, v. 16, n. 4, p. 455-462, 2006.

SOUSA, C. R. **Influência do extrato hidroalcoólico de *Polygala paniculata* como coadjuvante no tratamento da doença periodontal induzida em ratos**. 2015. Dissertação (Graduação em Odontologia) - Departamento de Odontologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289-306, 2006.