

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DA *Gossypium hirsutum* L. CONTRA CEPAS DE *Staphylococcus aureus*

ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF GROSS ETHANOLIC EXTRACT OF *Gossypium hirsutum* L. AGAINST *Staphylococcus aureus* STRAINS

LETÍCIA ATAÍDE DELGADO¹, DANIELE DE SOUZA SIQUEIRA¹, JOSÉ LUCAS SOARES FERREIRA¹, JOYCE NATIELLE MIRANDA CAVALCANTE¹, REBECA CÍCERA MENDES DE OLIVEIRA SILVA¹, RAFAEL CARTAXO FILGUEIRA¹, RAQUEL VIEIRA BEZERRA¹, HELOISA MARA BATISTA FERNANDES DE OLIVEIRA², MARIA DAS GRAÇAS VELOSO MARINHO³, ABRAHÃO ALVES DE OLIVEIRA FILHO^{3*}

1. Acadêmico(a) do curso de graduação do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande; 2. Farmacêutica-Bioquímica do Hospital Universitário Ana Bezerra da Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 3. Professor(a) Doutor(a) do curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande.

* Estrada Patos-Teixeira, Jatobá, Patos, Paraíba, Brasil. CEP: 58700-970. abraham.farm@gmail.com.br

Recebido em 28/08/2018. Aceito para publicação em 24/09/2018

RESUMO

Plantas medicinais têm demonstrado elevado poder de cura. A espécie *G. hirsutum* L. é amplamente encontrada no Nordeste. Seu extrato apresenta substâncias como alcalóides, flavanóides, saponinas e tanóides. O presente estudo objetiva avaliar in vitro a ação antibacteriana do extrato da *G. hirsutum* L. contra *Staphylococcus aureus*. Para a avaliação da atividade antibacteriana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) utiliza-se a técnica de microdiluição. Em uma placa de 96 orifícios, 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. 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. Observou-se que o extrato em estudo apresentou CIM50 de 256 µg/mL e CBM50 maior que 1024 µg/mL. Diante dos resultados obtidos pode-se afirmar que o extrato possui forte efeito antibacteriano frente às cepas de *S. aureus*.

PALAVRAS-CHAVE: Fitoterapia; Microbiologia; Farmacologia.

ABSTRACT

Medicinal plants have shown healing power. The species *G. hirsutum* L. is widely found in the Northeast. Its extract contains substances such as alkaloids, flavanoids, saponins and tanoids. The present objective is to evaluate in vitro the antibacterial action of the extract of *G. hirsutum* L. against *Staphylococcus aureus*. For an evaluation of the antibacterial activity and the Minimum Inhibitory Concentration (MIC), use a microdilution technique. In a 96-well plate, the Mueller Hinton caliber and the ethanolic extract under study were added at different concentrations. The assay was performed in duplicate. As plates were incubated at 37 ° C for 24-48

hours. After reading the CIM, aliquots of 20 µL were removed from each well that did not show bacterial growth, and transferred to wells of a new plaque, devoid of any antimicrobial. The inoculated plaques were aseptically closed and incubated at 35 ° C, and the MBCs were stored after 48 h. It was observed that the extract under study presented MIB50 of 256 µg / mL and CBM50 greater than 1024 µg / mL. In view of the obtained results it can be affirmed that the extract has anti-bacterial effect against the strains of *S. aureus*.

KEYWORDS: Phytotherapy; Microbiology; Pharmacology

1. INTRODUÇÃO

As bactérias são micro-organismos patogênicos que ao colonizarem humanos causam infecções, como as da cavidade oral, cada vez mais difíceis de serem tratadas com antibióticos triviais¹. 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 sintética².

O uso terapêutico de plantas medicinais possui origem em primórdios da medicina, os primeiros registros do uso de fitoterápicos datam da China do período de 3000 a.C.³. Estudos experimentais com extratos de plantas têm mostrado os produtos naturais como uma fonte de novos agentes antimicrobianos⁴.

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 antibacteriana, anti-inflamatória, anti-hemorrágica e anestésica^{5,6}.

Uma opção de planta medicinal é a espécie *Gossypium hirsutum* L., que 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 cicatrizante⁷.

Comunidades ribeirinhas do município de Manacapuru, Amazonas, utilizam plantas da Família Malvaceae, para inflamações, pneumonia, cólica, tosse, gastrites⁸.

Dessa forma, o objetivo desse trabalho é avaliar o potencial antimicrobiano do extrato etanólico bruto da *Gossypium hirsutum* L contra a bactéria *Staphylococcus aureus* verificando antes a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

2. MATERIAL E MÉTODOS

1.1 Ensaios in vitro

1.1.1 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).

1.1.2 Espécies Bacterianas e Meio de cultura

Foram utilizadas bactérias Gram-positivas sendo elas: *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Staphylococcus aureus* 101, *Staphylococcus aureus* 102, *Staphylococcus aureus* 103, *Staphylococcus aureus* 104, *Staphylococcus aureus* 105, *Staphylococcus aureus* 106, 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 caldo Mueller Hinton (MH), a uma temperatura de 4 °C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em caldo Mueller Hinton e incubados a 35 °C. No estudo da atividade antimicrobiana utilizou-se um inóculo bacteriano de aproximadamente 1,5 x 10⁸ UFC/mL padronizado de acordo com a turbidez do tubo 0,5 da escala de McFarland^{9,10}.

1.1.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima foi determinada pela técnica de micro diluição em caldo^{9,10}. Foram utilizadas placas de 96 orifícios estéreis e com tampa.

Em cada orifício da placa, adicionou-se 100 µL do meio líquido caldo Mueller Hinton duplamente concentrado. Em seguida, acrescentou-se 100 µL da emulsão do extrato na concentração inicial de 2048 µg/mL (também duplamente concentrado), que foram dispensados nas cavidades da primeira linha da placa, 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 adicionado 10 µL do inóculo de aproximadamente 1,5 x 10⁸ 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 caldo Mueller Hinton 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 foram colocados 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 caldo Mueller Hinton 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.

1.1.4 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 inoculadas 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 foram adicionadas. As placas foram incubadas por 24 horas a 35-37 ° C e depois se confirmou a concentração capaz de inibir o crescimento global de espécies bacterianas, verificado onde não houve coloração do indicador^{11,12}.

3. RESULTADOS

Analisando os resultados da CBM pode-se ver que o extrato da *G. hirsutum* L. possui atividade bacteriostática contra espécies de *S. aureus*, pois sua CBM₅₀ (Concentração Bactericida Mínima capaz de inibir 50% das cepas estudadas) foi maior do que 1024 µg/mL frente às cepas de *S. aureus*.

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 *Staphylococcus aureus*.

Cepas	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>S. aureus</i>		
ATCC 29213	256	-
SA 101	512	-
SA 102	-	-
SA 103	-	-
SA 104	-	-
SA 105	512	-
SA 106	256	256

(-) Concentrações maiores que 1024 µg/mL, não avaliadas neste estudo. Fonte: **Autoria Própria**.

4. DISCUSSÃO

Segundo Sartoratto (2010)¹³, os resultados com valores entre 50-500 µg/ml de concentração do extrato 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 *Staphylococcus aureus*, considerado como forte, pois sua CIM₅₀ (Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 50% das bactérias estudadas) foi de 256 µg/mL.

Conforme, Hafidh et al. (2011)¹⁴, 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.* possui atividade bacteriostática contra espécies de *S. aureus*, pois sua CBM₅₀ (Concentração Bactericida Mínima capaz de inibir 50% das cepas estudadas) foi maior do que 1024 µg/mL frente às cepas de *S. aureus*.

As plantas representam uma importante fonte de medicamento devido à grande diversidade de moléculas com potencial medicinal, contribuindo para a busca de novos produtos mais eficazes e menos tóxicos contra microrganismos patogênicos e multirresistentes¹⁵.

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 inflamação¹⁶. Há várias espécies com função antimicrobiana, anestésico local, antiviral contra o vírus do herpes, cicatrizante, calmante, analgésica, fungicida, necessidades estas do cotidiano odontológico¹⁷.

Os resultados apresentados concordam com os resultados obtidos por Miranda et. al (2010)¹⁸ reforçou os dados encontrados neste estudo, constatando atividade antibacteriana da *G. hirsutum L.*, contra a *S. aureus*, em diferentes graduações alcoólicas, apresentando melhor resultado na graduação de 50%.

Testes fitoquímicos na *G. hirsutum L.* constataram a presença de metabolitos secundários que podem estar

relacionados com a atividade antibacteriana frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.¹⁹

5. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, observa-se um elevado potencial e eficácia antimicrobiana do extrato etanólico bruto da *G. hirsutum L.*, 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.

AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Universidade Federal de Campina Grande por toda a colaboração com esta pesquisa.

REFERÊNCIAS

- [1] González MJ, Marioli JM. Antibacterial Activity of Water Extracts and Essential Oils of Various Aromatic Plants against *Paenibacillus larvae*, the Causative Agent of American Foulbrood. *Journal of Invertebrate Pathology*. 2010; 104(3):209-213.
- [2] Nascimento P, Nascimento A, Rodrigues C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev Bras Farmacogn*. 2007;17(1):108-113.
- [3] França ISX, Souza JAS, Baptista RS, et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. *Revista Brasileira de Enfermagem*. 2008; 61(2):201-208.
- [4] Sakunpak A, Panichayupakaranant P. Antibacterial activity of Thai edible plants against gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad spectrum antibacterial polyisoprenylated benzophenone, chamuangone. *Food Chemistry*. 2012;130(4):826-831.
- [5] Silva MIG, Gondim APS, Nunes IFS, Sousa FCF. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Rev. Bras. Farmacogn*. 2006; 16(4):455-462.
- [6] Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn*. 2007; 17(1):114-140.
- [7] Lorenzi H, Abreu Matos F. *Plantas medicinais no Brasil*. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora; 2008.
- [8] Vásquez SPF, Mendonça MS, Noda SN. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. *Acta Amazonia*; 2014; 44(4):457-472.
- [9] Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials in vitro and in experimental animal infections. 1st ed. *Antibiotics in Laboratory Medicine*. New York: Williams & Wilkins; 1991; 739-788.
- [10] Hadacek F, Greger H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis*. 2000;11(3):137-147.
- [11] Palomino J, Martin A, Camacho M, et al. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method

- for detection of drug resistance *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2002;46(8):2720-2722.
- [12] Mann C, Markham J. A new method for determining the minimum inhibitory concentration of essential oils. *Journal of Applied Microbiology*. 1998;84(4):538-544.
- [13] Sartoratto A, Machado A, Delarmelina C, et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004;35(4):275-280.
- [14] Hafidh R, Abdulmir L, Vern A, et al. Inhibition of Growth of Highly Resistant Bacterial and Fungal Pathogens by a Natural Product. *The Open Microbiology Journal*. 2011;5(1):96-106.
- [15] Barbosa-Filho J, Nascimento Júnior F, Tomaz A, et al. Natural products with antileprotic activity. *Rev Bras Farmacogn*. 2018; 17(1):141-148.
- [16] Sousa C. Influência do extrato hidroalcoólico de *polygala paniculata* como coadjuvante no tratamento da doença periodontal induzida em ratos [Graduação]. Curso de Odontologia, UFSC, Florianópolis; 2015.
- [17] Assis C. Plantas medicinais na odontologia. *Rev Bras Odontol*. 2009;66(1):72-75.
- [18] Miranda G, Santana G, Machado B. Avaliação da atividade antibacteriana das plantas *Gossypium hirsutum* L. (Algodão) e *Phyllanthus niruri* L. (quebra pedra) frente a *Staphylococcus Aureus*. *Anais Iii Simpoc*. 2010;2(1):53-58.
- [19] Miranda G, Santana G, Machado B, et al. Atividade antibacteriana in vitro de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*. 2013;15(1):104-111.