

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CURSO: BACHARELADO EM ODONTOLOGIA**

LETÍCIA ATAÍDE DELGADO

**EFEITO ANTIBACTERIANO DO EXTRATO ETANÓLICO
BRUTO DA *Gossypium hirsutum* L.**

PATOS – PB

2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE SAÚDE E TECNOLOGIA RURAL
CURSO: BACHARELADO EM ODONTOLOGIA

LETÍCIA ATAÍDE DELGADO

**EFEITO ANTIBACTERIANO DO EXTRATO ETANÓLICO
BRUTO DA *Gossypium hirsutum* L.**

**Trabalho de conclusão de curso de
graduação (TCC) apresentado à Coordenação
do Curso de Odontologia da Universidade
Federal de Campina Grande como requisito
para a obtenção do título de Bacharel em
Odontologia.**

**Orientador: Prof^o. Dr^o. Abrahão Alves de
Oliveira Filho**

PATOS – PB

2018

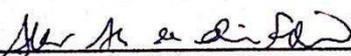
EFEITO ANTIBACTERIANO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DA *Gossyplum hirsutum* L.

Trabalho de conclusão de curso de graduação (TCC) apresentado à Coordenação do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Campina Grande como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

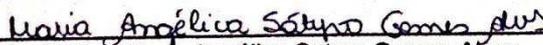
Orientador: Prof^o. Dr^o. Abrahão Alves de Oliveira Filho

Aprovado em: 26/07/2018

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho – Orientador
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG



Prof^o. Dr^o. Maria Angélica Satyro Gomes Alves – 1º Avaliador
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG



Prof^o. Dr^o. Gymenna Maria Tenório Guênes – 2º Avaliador
Universidade Federal de Campina Grande – UFCG

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO CSRT DA UFCG

D352e Delgado, Letícia Ataíde

Efeito antibacteriano do extrato etanólico bruto da *Gossypium hirsutum* L. / Letícia Ataíde Delgado. – Patos, 2018.
54f.; il. color.

Trabalho de Conclusão de Curso (Odontologia) – Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Saúde e Tecnologia Rural, 2018.

"Orientação: Prof. Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho".

Referências.

1. Farmacologia. 2. Fitoterapia. 3. Microbiologia. I. Título.

CDU 616-085:619

Dedico este trabalho, assim como todas as minhas conquistas passadas e as que estão por vir, a Deus, por me dar forças, discernimento e vontade; a minha família por ter me apoiado em todas as minhas decisões.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus, responsável por tudo que eu sou hoje e pelo que ainda serei, meu guia, minha força em todas as etapas, e que tem infinita bondade e generosidade comigo.

À minha família, minha mãe Adriana Ataíde Delgado, meu pai Joabson Guedes Delgado, e meu irmão Vinícius Ataíde Delgado, que por mais que não entendam minhas decisões, embarcam junto, por todo carinho, amor, ensinamentos e por todas as renúncias, que não foram poucas.

Aos meus avôs, Antonio e Eliezer, que não estão mais aqui, mas me deram muito amor e me deixaram muitas lições, as minhas avós Salete e Inês, que me dão muito amor e ainda me ensinam.

A meu namorado, Tarcísio, meu amor, meu melhor amigo, meu companheiro, por toda paciência, amor, compreensão e dedicação, se fez presente desde o início dessa caminhada e faz dos meus sonhos, os dele.

As minhas primas, Késsia e Kênia que muito me ajudaram durante esses anos, com café, conselhos, e o conforto de ter família longe de casa.

À Universidade Federal de Campina Grande – Campus Patos, todo seu corpo docente, funcionários, direção e administração, meu muito obrigado pela acolhida durante esses cinco anos de graduação e pelo empenho incessante em sempre fazer com que adquiríssemos um ensino de qualidade.

Ao professor Dr. Abrahão Alves de Oliveira Filho, por toda sua dedicação não só comigo, mas como todos os seus alunos, pela paciência, pelo dom de ensinar, executado com muito êxito, por todas as oportunidades a mim oferecidas, por diversas vezes ter sido mais que um professor, um amigo. Um exemplo de mestre a ser seguido.

Às minhas amigas do colégio: Karlla, Paloma, Mariana, Marina, Vanessa, Myllena, Nathália, que cresceram comigo e continuam me apoiando, compartilhando risadas e sonhos, cumplicidade e amor entre nós nunca faltará.

Aos meus amigos de patos: Marcela, Randerson, Paulo, Richelle, Rayane, Karina, Vinícius, Matheus e Pedro, que me ajudaram muito a enfrentar esse anos longe de casa, se tornaram minha família aqui, guardo todas as lembranças com carinho imenso, nunca serão esquecidos.

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher. “

Cora Coralina

RESUMO

Plantas medicinais têm demonstrado elevado poder de cura e o conhecimento de suas propriedades terapêuticas permanece arraigado na tradição de diversas culturas. A espécie *G. hirsutum* L. pertence da família Malvaceae, amplamente encontrada no Nordeste. Seu extrato apresenta substâncias como alcaloides, flavanoides, saponinas e tanoides. A atividade biológica dos alcaloides abrange propriedades, que incluem, anticancerígena, antiparasitária, anti-inflamatória, antimicrobiana, inseticida, entre outras. O presente estudo objetiva avaliar *in vitro* a ação antibacteriana do extrato da *Gossypium hirsutum* L. contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae*. Para a realização dos ensaios farmacológicos, as substâncias foram solubilizadas em DMSO e diluídas em água destilada. Para a avaliação da atividade antibacteriana e determinação da CIM utiliza-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 microorganismo. Observou-se que o extrato em estudo apresentou valores de CIM₅₀ entre 256 µg/mL e maiores do que 1024 µg/mL e valores de CBM₅₀ entre 256 µg/mL e maiores do que 1024µg/mL para as cepas testadas. Diante dos resultados obtidos pode-se afirmar que o extrato possui um promissor efeito antibacteriano contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*.

Palavras-chaves: Fitoterapia. Farmacologia. Microbiologia

ABSTRACT

Medicinal plants have demonstrated superior healing power and knowledge of their permanent therapeutic properties rooted in the culture tradition. The specie *G. hirsutum* L. belongs to the family Malvaceae, widely found in the Brazilian Northeast. Its extract presents substances like alkaloids, flavonoids, saponins and tanóides. The biological activity of alkaloids encompasses property, ancient, anticancer, antiparasitic, anti-inflammatory, antimicrobial, insecticide, among others. The objective of this paper is an in vitro evaluation of the antibacterial action of *Gossypium hirsutum* L. extract against *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Klebsiella pneumoniae* in different concentrations. For the pharmacological tests, the substances were solubilized in DMSO and diluted in distilled water. 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 presented MIC₅₀ values between 256 µg / mL and greater than 1024 µg / mL and MBC₅₀ values between 256 µg / mL and greater than 1024 µg / mL for the strains tested. In view of the obtained results it can be affirmed that the extract has a promising antibacterial effect against the strains of *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*.

.
Key-words: Phytoterapy. Farmacology. Microbiolog

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. – <i>Gossypium hirsutum</i> L.	15
--	----

LISTA DE TABELAS

- 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 *S. aureus*.26
- Tabela 2** - 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*.....33
- Tabela 3** Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) em µg/mL do extrato etanólico bruto da *G. hirsutum* L. contra diferentes cepas de *E. coli*.42
- Tabela 4** Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) em µg/mL do extrato etanólico bruto da *G. hirsutum* L. contra diferentes cepas de *K. pneumoniae*.42

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Por Cento
°C	Graus Celsius
®	Marca registrada
x	Multiplicação
μ	Micro
v/v	Volume por Volume
UFC/mL	Unidade de Formação de Colônias por Mililitros
μg/mL	Micro gramas por mililitros
μL	Microlitros

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CBM	Concentração Bactericida Mínima
DMSO	Dimetilsulfóxido
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>G. hirsutum L.</i>	<i>Gossypium hirsutum L.</i>
<i>K. pneumoneae</i>	<i>Klebsiella pneumoneae</i>
LPS	Lipopolissacarídeos
MH	<i>Mueller Hinton</i>
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Prevotella aeruginosa</i>
PNPIC	Politica Nacional de Práticas Integrativas Complementares
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
SN	Sem Número
SUS	Sistema Único de Saúde

SUMÁRIO

RESUMO	3
ABSTRACT	5
1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVOS	12
3.1 OBJETIVO GERAL	12
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	12
3. REVISÃO DE LITERATURA	13
3.1 Fitoterapia e odontologia.....	13
4.2. <i>Gossypium hirsutum</i> L.	14
4.3. Bactérias Patogênicas	15
REFERÊNCIAS	18
ARTIGO I	21
ARTIGO II	30
ARTIGOIII	43
ANEXOS	46
NORMAS DA REVISTA I	47
NORMAS DA REVISTA II	51
NORMAS DA REVISTA III.....	54

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 triviais (GONZÁLEZ, MARIOLI, 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 uso terapêutico de plantas medicinais possui origem nos primórdios da medicina, os primeiros registros do uso de fitoterápicos datam da China do período de 3000 a.C. (FRANÇA, 2008).

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 (SILVA et al., 2006; AGRA et al., 2007)

Estudos experimentais com extratos de plantas têm mostrado os produtos naturais como uma fonte de novos agentes antimicrobianos (SAKUNPAK, PANICHAYUPAKARANANT, 2012). Os compostos fenólicos, encontrados nos extratos, se sobressaem, por suas atividades antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (KLANČNIK et al., 2010).

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).

Diante dos fatos apresentados, acerca da importância das plantas medicinais e da busca incessante aos antimicrobianos, o referido estudo se propõe a investigar a atividade antibacteriana do extrato etanólico bruto das folhas de *Gossypium hirsutum*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antimicrobiano do extrato etanólico bruto da *Gossypium hirsutum* L. contra bactérias patogênicas gram positivas e gram negativas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a Concentração Inibitória Mínima do extrato etanólico de *Gossypium hirsutum* L. ;

Verificar a Concentração Bactericida Mínima do extrato etanólico de *Gossypium hirsutum* L.;

Comparar os dados obtidos do extrato etanólico de *Gossypium hirsutum* L. com os dados da literatura.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Fitoterapia e odontologia

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 multirresistentes (BARBOSA FILHO, et al., 2007).

A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC), do Ministério da Saúde, insere o uso da Fitoterapia no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006a e 2006b), com isso o cirurgião-dentista é apto a prescrever e incluir a fitoterapia nas práticas de rotina. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, na RDC nº 26/2014, mostra que a fitoterapia se utiliza de vegetais na preparação de formas farmacêuticas, na forma de extratos, cápsulas, tinturas e pomadas, utilizados para tratamento de doenças e manutenção de saúde. O Medicamento fitoterápico pode ser considerado simples, quando o princípio ativo é proveniente de apenas uma espécie vegetal, ou composto, se o princípio ativo for proveniente de mais de uma espécie vegetal. (ANVISA, 2014).

A fitoterapia, que ainda não é uma especialidade médica, mas é considerada uma terapia alternativa, embora seja uma alternativa de baixo custo, fácil acesso, os fitoterápicos enfrentam barreiras como a falta de conhecimento dos profissionais, e a escassez de estudos clínicos que comprovem as propriedades farmacológicas. No entanto, vem-se observando um aumento do interesse dos profissionais da saúde em utiliza-la (OLIVEIRA, AZIKUE, 2001; PINHEIRO, ANDRADE, 2008).

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 (ASSIS, 2009).

Segundo Aleluia et al. (2015) as espécies *Syzygium aromaticum* L., *Matricaria recutita* L., *Punica granatum*, *Malva sylvestris*, *Uncaria tomentosa*, *Apis mellífera* estão entre os fitoterápicos mais utilizados em Odontologia, os quais possuem principalmente ação antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante.

4.2. *Gossypium hirsutum* L.

Plantas da Família Malvaceae, a qual pertence a *Gossypium hirsutum* L., são usadas em comunidades ribeirinhas do município de Manacapuru, Amazonas, para Inflamações, pneumonia, cólica, tosse, gastrites. (VASQUEZ, MENDONÇA, NODA, 2014)

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. conhecida como algodão pertence à família Malvaceae é cultivada principalmente para fornecimento de matéria prima para fins industriais. 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 E MATOS, 2002).

Testes fitoquímicos na *Gossypium hirsutum* L. constataram a presença de metabólitos secundários que podem estar relacionados com a atividade antibacteriana frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. (MIRANDA et. al, 2013).

Fotografia 1 – *Gossypium hirsutum*

Fonte: <https://www.uniprot.org/taxonomy/3635>

4.3. Bactérias Patogênicas

Bactérias pertencem ao reino Monera segundo a classificação de Robert Wittaker e podem ser classificadas de acordo com sua forma em cocos, bacilos, vibriões, espirilos e espiroquetas. São divididas em gram-positivas e gram-negativas. As gram-positivas possuem parede celular composta em sua maioria por peptidoglicanos, já as gram-negativas possuem uma estrutura mais complexa em sua parede celular, possui poucas camadas de peptidoglicanos, espaço periplasmático, sua membrana externa é formada por dupla camada lipídica, lipoproteínas e lipopolissacarídeos (LPS) que conferem um fator de virulência maior a esses tipos de bactérias (TRABULSI; ALTERTHUM 2015).

Staphylococcus aureus, é um cocos Gram positivo, o agente mais comum em infecções piogênicas e abscessos, e em indivíduos imunossuprimidos pode causar infecções graves como osteomielite e bacteremia, geralmente associada a abscessos metastáticos ou até

endocardite.(SEMENOFF, SEGUNDO, BASIALI; 2008). É uma das principais causas de infecções crônicas em implantes médicos, crescem em uma superfície do hospedeiro ou do corpo estranho, resultando em uma comunidade de bactérias nesse local, e essas comunidades são complexamente envolvidas e geralmente são consideradas biofilmes. Embora a cavidade oral não seja seu *habitat* normal, foi possível o isolar a partir de biofilme dentário de pacientes com infecção respiratória. Há comprovação de que o *Staphylococcus aureus* pode constituir, de fato, parte da microbiota oral (KUTSCH, YOUNG; 2011)

Em cerca de 80 a 90% dos casos de osteomielite em maxilares, *Staphylococcus aureus* e *epidermidis* foram identificadas como sendo bactérias responsáveis pelo processo. (LUCON, 2003)

Tirali et al. (2009) constatou que a *Staphylococcus aureus* está entre as espécies mais resistentes encontradas em canais radiculares infectados, sendo associada ao insucesso de tratamentos endodônticos. Outras infecções orais também podem ser causadas por *Staphylococcus aureus*, a exemplo a queillite angular, parotidite e mucosite estafilocócica.

Infecções clínicas com *S. aureus* provavelmente permanecerão comuns pois espectro das manifestações clínica continua a mudar. Foi constatado, nas últimas duas décadas, mudanças na epidemiologia das infecções por *S. aureus* tais como as infecções associadas de aos serviços de saúde, a endocardite bacteriana, infecções protéticas, pleuropulmonares, meningites, abscesso epidural, além de ter sido encontrada também em biofilmes nos implantes dentais (TONG; et al., 2015, SALVI; et al, 2008).

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram-negativo da família Enterobacteriaceae, podendo ser encontrada em trato respiratório alto e trato gastro-intestinal e urinário, causando pneumonia lobar e infecção urinária e septicemia. É uma das bactérias mais comumente encontradas em todo o mundo, sendo comum em casos de infecção do trato respiratório. Tem sido reconhecida como um patógeno pulmonar, desde a sua descoberta, há mais de 100 anos (KO, et al; 2002).

Carvalho, Rotbland e Nogueira, 2017 sugerem relação entre a pneumonia nosocomial, que tem como causa a *Klebsiella pneumoniae*, e a doença periodontal, uma vez que a infecção bacteriana em pacientes com

periodontite pode favorecer a colonização da orofaringe, perpetuando a infecção através de mediadores inflamatórios e imunológicos, facilitando assim a colonização por patógenos bucais e respiratórios nos tecidos pulmonares.

A *Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, de oxidase negativa, catalase positiva, fermentador de lactose, sacarose e glicose, pode apresentar motilidade. Esta espécie pode ser patogênica ao homem e outros animais, ocasionando desde doenças no trato gastrointestinal até o óbito (YNGST et al., 2006; WELCH et al., 2006).

Dentre as bactérias gram-negativas envolvidas com infecções endodônticas destaca-se *Escherichia coli*, várias estruturas celulares desta bactéria, como flagelos e cápsulas e a molécula de lipopolissacarídeo (LPS), contribuem com a virulência da espécie. Essas bactérias podem alcançar a região intracanal principalmente quando a polpa dentária fica exposta à cavidade bucal por processos cariosos ou traumas coronários (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015 ; LEONARDO; SILVA; NELSON FILHO, 2004).

Suas endotoxinas estão associadas a necroses pulpareas de canais radiculares e lesões periapicais crônicas, devido a suas características de bactérias anaeróbias, especialmente gram-negativas (MAEKAWA et. al; 2011).

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 (LYZACK, CANNON, PIER, 2002; 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).

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. 114-40, 2007

ALELUIA, C. M., et al. Fitoterápicos na Odontologia. **Rev. Odontol. Univ. Cid. São Paulo**, São Paulo, v. 27, n. 2, p.126-134, maio 2015

ASSIS, C.; Plantas medicinais na odontologia. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 1, p.72-75, Janeiro, 2009. Semestral.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica, Manual de Microbiologia Clínica para o Controle de Infecção em Serviços de Saúde, Procedimentos Laboratoriais: da Requisição do Exame à Análise Microbiológica, Brasília, 2004

BARBOSA FILHO, JM; NASCIMENTO JÚNIOR, F.A., TOMAZ, A.C.A. , ATHAYDE FILHO P.F., SILVAA, M.S., CUNHA E.V.L., SOUZA, M.F.V., BATISTA, L.M., DINIZ, M.F.F.M., 2007. Natural products with antileprotic activity. **Rev Bras Farmacogn** 17: 141-148.

BRASIL. 2006a. **Ministério da Saúde**. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS - PNPIC-SUS. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 92 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. 2006b. **Ministério da Saúde**. Portaria N° 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, DF.

CARVALHO, P. E. R.; GAIAD, S. **Agência de informações embrapa: Espécies Arbóreas Brasileiras**. 2002. Disponível em: <http://www.agencia.cnptia.embrapa.br/gestor/especies_arboreas_brasileiras/arvore/CONT000fu1ekyj602wyiv807nyi6s9rqihfq.html>. Acesso em: 20 fev. 2018

CARVALHO, P. A.; ROTBLAND, M.; NOGUEIRA, A. C. O. A doença periodontal como fator de risco para a pneumonia nosocomial. **International Journal of Science Dentistry**, Niterói, n.48, julho 2017

FERREIRA, H.; LALA, E. R. P.; Pseudomonas aeruginosa: Um alerta aos profissionais de saúde. **Rev Panam Infectol**, Foz do Iguaçu, v. 2, n. 12, p.44-50, 2010.

FRANÇA, I.S.X.;SOUZA, A.J.; BAPTISTA, R.S., BRITTO, V.R.S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais.**Rev. Bras. de Enferm.** V. 61, n. 2,p. 201-8, Brasília, 2008.

KIEDROWSKI, M. R.; HORSWILL, A. R.; New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. **Annals Of The New York Academy Of Sciences**, [s.l.], v. 1241, n. 1, p.104-121, dez. 2011. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1749-6632.2011.06281.x>

KLANČNIK, A.; PISKERNIK, S.; JERŠEK, B.; MOŽINA, S. S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal of microbiological methods**, v. 81, n. 2, p. 121-126, 2010.

KO W.C. *et al.* Community-Acquired Klebsiella pneumoniae Bacteremia: Global Differences in Clinical Patterns. *Emerging Infectious Diseases*. v.8 n.2, p. 160-166, 2002.

KUTSCH V.K; Young D.A. New directions in the etiology of dental caries disease. **Journal of the California Dental Association** v. 39 p. 716. 2011

LEONARDO, M.R.; SILVA R.A.B.; ASSED S.; NELSON-FILHO P. Importance of Bacterial endotoxin (LPS), **Endodontics. Journal Appl Oral Science**. V. 12, n.2, p.93, 2004

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

LORENZI, H.;MATOS, F.J.A. *Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

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**, [s.l.], v. 87, n. 4, p.234-240, 2014. Elsevier BV.

LUCON, R.P. **OSTEOMIELITES: tipos, causas, tratamentos e implicações clínicas**. Monografia apresentada para conclusão de curso, Universidade de Campinas. Piracicaba, 2003.

NASCIMENTO, P. F. C.; *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 3, p. 108-113, 2007.

MAEKAWA L.E.; *et al.* *In vitro* evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on Escherichia coli and its endotoxin in root canals. **Journal of Applied Oral Science**, 2011; v. 19 n.2, p.106-12, 2011

OLIVEIRA, F.; ASIKUE, G. Fundamentos de Farmacobotânica. Bragança Paulista: **Atheneu**; 2001.p. 118.

PINHEIRO, Marcos Luciano Pimenta; ANDRADE, Eduardo Dias de. Fitoterápicos como alternativa ao uso de medicamentos convencionais em odontologia. **Revista Abo Nac.**, M, v. 16, n. 2, p.107-110, abr. 2008.

SEMENOFF T.A.D.V.; SEGUNDO A.S.; BIASOLI E.R. Efetividade antimicrobiana *in vitro* de enxaguatórios bucais frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Odonto Ciências**; v. 27, n.1, p. 62-67. 2008

SILVA, M. I. G. *et al.* Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.16, n.4, p. 455-462, out/ dez 2006.

SAKUNPAK, A.; PANICHAYUPAKARANANT P.; Antibacterial activity of Thai edible plants gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad spectrum antibacterial polyisoprenylated benzophenone, chamuangone. **Food Chemistry**, v. 130, p. 826-831, 2012

SALVI G.E., *et al.* One-year bacterial colonization patterns of *Staphylococcus aureus* and other bacteria at implant and adjacent teeth. **Clinical oral implants Research**, [S.l.], v, 19, n. 3, p. 242-248, jan. 2008

SOUSA, C.R.; **INFLUÊNCIA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE POLYGALA PANICULATA COMO COADJUVANTE NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS.** 2015. 66 f. TCC (Graduação) - Curso de Odontologia, Ufsc, Florianópolis, 2015.

TIRALI, R.E.; TURAN, Y.; AKAL, N.; KARAHAN, Z.C.; *In vitro* antimicrobial activity of several concentrations of NaOCl and Octenisept in elimination of endodontic pathogens. *Oral Surgery Oral Medical Oral Pathology Oral Radiology Endodontic*. 2009; V.108, n. 5 p117-120. Julho 2009.

TONG, S. Y. C., *et al.* *Staphylococcus aureus* infections: Epidemiology, Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Management. **Journals ASM.org**, North Carolina, v.28, n. 3, p. 603-660, maio 2015

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

WELCH, R.A. *et al.* **The prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria**,: A Handbook on the Biology of Bacteria. 3. ed. New York: Springer-verlag New York, 2006. 6 v.

YNGST, S.L.; SAAD, M.D.; FELT, S.A. Classifying *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.8, p.1297-1298, 2006

ARTIGO I

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

Letícia Ataíde Delgado

Abrahão Alves de Oliveira Filho

RESUMO

Plantas medicinais têm demonstrado elevado poder de cura. A espécie *G. hirsutum* L. é amplamente encontrada no Nordeste. Seu extrato apresenta substâncias como alcaloides, flavanoides, saponinas e tanoides. 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 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 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 512 µg/mL e CBM₅₀ de 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

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

ABSTRACT

Medicinal plants have shown high healing power. The specie *G. hirsutum* L. is widely found in the brazilian northeast. Its extract contains substances such as alkaloids, flavanoids, saponins and tanoids. The presente study aims to evaluate *in vitro* the antibacterial action of the extact of *G. hirsutum* L. against *Staphylococcus aureus*. 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 MIC₅₀ of 512 µg/mL and MBC₅₀ OF 1024 µg/ML. In view of the obtained results it can be affirmed that the extract has a strong antibacterial 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 triviais (GONZÁLEZ; MARIOLI, 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 uso terapêutico de plantas medicinais possui origem nos primórdios da medicina, os primeiros registros do uso de fitoterápicos datam da China do período de 3000 a.C. (FRANÇA,2008). Estudos experimentais com extratos de plantas têm mostrado os produtos naturais como uma fonte de novos agentes antimicrobianos (SAKUNPAK; PANICHAYUPAKARANANT,2012).

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-hemorragica e anestésica (SILVA et al., 2006; AGRA et al., 2007).

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 cicatrizante (LORENZI, MATOS, 2002).

Comunidades ribeirinhas do município de Manacapuru, Amazonas, utilizam plantas da Família Malvaceae, para inflamações, pneumonia, cólica, tosse, gastrites. (VASQUEZ, MENDONÇA, NODA, 2014)

Dessa forma, o objetivo desse trabalho é avaliar o potencial anti microbiano 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 MÉTODO

2.1.Ensaio *in vitro*

2.1.1.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).

2.1.2 Espécies Bacterianas e Meio de cultura

Foram utilizadas bactérias Gram-positivas sendo elas: *Staphylococcus aureus* ATCC 25925, *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 ágar *Mueller Hinton* (MH), a uma temperatura de 4 °C, sendo utilizados para os ensaios repiques de 24 horas em ágar *Mueller Hinton* e incubados a 35 °C. No estudo da atividade antimicrobiana utilizou-se 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).

2.1.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima foi 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, adicionou-se 100 µL do meio líquido ágar *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 $1-5 \times 10^8$ 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 ágar *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 ágar *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.

2.1.4.Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A concentração bactericida mínima (CBM) também foi determinada para as cepas de bactérias. Após a leitura da CIM em 48 horas, alíquotas de 20 µL foram retiradas de cada poço da placa de microtitulação que não apresentaram crescimento bacteriano, e transferidas para poços de uma nova placa de microtitulação contendo 100 µL de caldo Mueller-hinton, desprovidas de qualquer antimicrobiano. As placas inoculadas são assepticamente fechadas e incubadas a 35 °C, e as CBMs serão registradas após 48 h. A CBM é definida como a menor concentração do extrato que resultar em inibição visível do crescimento do micro-organismo (ERNST et al., 2002; PEREIRA et al., 2011).

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

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 multirresistentes (BARBOSA FILHO; et al., 2007).

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. (ASSIS, 2009)

Segundo Sartoratto (2010), 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. A

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. 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)
S. aureus		
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

Os resultados apresentados concordam com os resultados obtidos por Miranda et. al (2010) reforçou os dados encontrados neste estudo, constatando atividade antibacteriana da *G. hirsutum* L., contra a *S. aureus*, em diferentes graduações alcoolicas, 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*. (MIRANDA et. al, 2013).

4.CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, observamos 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.

5.AGRADECIMENTOS OU FINANCIAMENTO

Agradeço à professora Dra. Maria das Graças Veloso Marinho da Universidade Federal de Campina Grande, por ter cedido o extrato utilizado no estudo, ao Prof. Abrahão, por toda sua paciência e dedicação com seus orientandos e aos colegas do Laboratório de fitoterapia, bioquímica e microbiologia da UFCG (LAFBIM – UFCG), por toda a colaboração com esta pesquisa.

6.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. 114-40, 2007

ASSIS, C. Plantas medicinais na odontologia. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro, v. 66, n. 1, p.72-75, Janeiro, 2009. Semestral.

BARBOSA FILHO, J.M.; NASCIMENTO JÚNIOR, F.A.; TOMAZ, A.C.A; ATHAYDE FILHO, P.F.; SILVA, M.S.; CUNHA, E.V.L.; SOUZA, M.F.V.; BATISTA,L.M.; DINIZ, M.F.F.M. 2007. Natural products with antileprotic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia** v. 17 p.141-148.

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

ERNST, E. J.; ROLING, E. E.; PETZOLD, C. R.; KEELE, D. J.; KLEPSE, M. E. In Vitro Activity of Micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: Microdilution, Time-Kill, and Postantifungal-Effect Studies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3846–3853, 2002

FRANÇA, I.S.X.;SOUZA, A.J.; BAPTISTA, R.S., BRITTO, V.R.S. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais.**Revista Brasileira de Enfermagem**. V. 61, n. 2,p. 201-8, Brasília, 2008.

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

HAFIDH RR, ABDULAMIR AS, VERN LS, BAKAR FA, ABAS F, JAHANSHIRI F, SEKAWI Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **Open Microbiol J**, v.5, p.96–106, 2011

LORENZI, H. e MATOS, F.J.A. *Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MIRANDA, G.S.; SANTANA, G.S.; MACHADO, B.B. et al. *In vitro* antibacterial activity of four plant species at diferente alcoholic contentes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v15 n.1, p.104-11, 2013

MIRANDA, G. S; SANTANA, G S.; MACHADO, B. B. Avaliação da atividade antibacteriana das plantas *Gossypium hirsutum* L. (Algodão) e *Phyllanthus niruri* L. (quebra pedra) frente a *Staphylococcus Aureus*. **Anais Iii Simpoc**, Viçosa, v. 2, n. 1, p.53-58, dez. 2010

NASCIMENTO, P. F. C.; *et al.* Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev Bras Farmacogn**, v. 17, n. 3, p. 108-113, 2007.

PEREIRA, F. O.; WANDERLEY, P. A.; VIANA, F. A. C.; et. Al, Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex bor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n. 1, p. 233-242, 2011.

SAKUNPAK, A.; PANICHAYUPAKARANANT P.; Antibacterial activity of Thai edible plants gastrointestinal pathogenic bacteria and isolation of a new broad spectrum antibacterial polyisoprenylated benzophenone, chamuangone. **Food Chemistry**, v. 130, p. 826-831, 2012

SILVA, M. I. G. *et al.* Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.16, n.4, p. 455-462, out/ dez 2006.

SOUSA, Camila Rodrigues de. **INFLUÊNCIA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE POLYGALA PANICULATA COMO COADJUVANTE NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS.** 2015. 66 f. TCC (Graduação) - Curso de Odontologia, Ufsc, Florianópolis, 2015.

VÁSQUEZ, S. P. F.; MENDONÇA, M. S. DE; NODA, S. N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, [s.l.], v. 44, n. 4, p.457-472, dez. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/1809-4392201400423>

ARTIGO II

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*.

L. A. Delgado^{1*}; A. A. de Oliveira Filho²

¹Graduação de Odontologia, Universidade Federal de Campina Grande, CEP, Patos-Paraíba, Brasil

²UACB/CSTR, UFCG, CEP, Patos-Paraíba, cep, Brasil

*leticia.ataidedelgado@gmail.com

(Recebido em dia de mes de ano; aceito em dia de mes de ano)

A busca do conhecimento a cerca de plantas medicinais vem acompanhado a evolução do homem através dos tempo. 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 microorganismo. 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

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

1. 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^{1,2}.

P. aeruginosa apresenta-se resistente 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 antimicrobianos³.

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 sintética⁴.

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 tempos⁵.

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 sintéticos⁶.

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-hemorragica e anestésica^{7,8}.

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 brasileiros⁹.

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 cicatrizante¹⁰.

2. 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 (UFPG).

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 ágar *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^{11,12}.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima é determinada pela técnica de microdiluição em caldo^{11,12}. 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 adicionada 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)

A concentração bactericida mínima (CBM) também foi determinada para as cepas de bactérias. Após a leitura da CIM em 48 horas, alíquotas de 20 µL foram retiradas de cada poço da placa de microtitulação que não apresentaram crescimento bacteriano, e transferidas para poços de uma nova placa de microtitulação contendo 100 µL de MH, desprovidas de qualquer antimicrobiano. As placas inoculadas são assepticamente fechadas e incubadas a 35 °C, e as CBMs serão registradas após 48 h. A CBM é definida como a menor concentração do extrato que resultar em inibição visível do crescimento do micro-organismo^{13,14}.

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 2. Observou-se que os resultados do extrato para as diversas cepas variou 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 2: 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>S. aureus</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: Autoria própria

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 inflamação¹⁵. Há várias espécies com função antimicrobiana, anestésico local, anti-viral contra o vírus da herpes, cicatrizante, calmante, analgésica, fungicida, necessidades estas do cotidiano odontológico¹⁶.

Segundo Sartoratto¹⁷, 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.¹⁸, 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*.

Encontrou-se resultados negativos^{19,20} 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.

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 ²¹.

3. 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.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lyczak JB, Cannon CL, Pier GB, Establishment of Pseudomonas aeruginosa infection: lessons from a versatile opportunist. *Microbes and Infection* 2000;2:1051-1060.
2. 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**, [s.l.], 2014; 87(4):234-240. Elsevier BV.
3. Ferreira H, Lala ERP. Pseudomonas aeruginosa: Um alerta aos profissionais de saúde. **Rev Panam Infectol**, Foz do Iguacu 2010; 2(12):44-50.
4. Nascimento PFC, et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Rev Bras Farmacogn**, 2007; 17(3):108-113.
5. Lopes GAD, et al. Plantas medicinais: indicação popular de uso no tratamento de hipertensão arterial sistêmica (HAS). *Rev. Ciênc. Extens.*, 2010; 6(2):143-155.
6. Turolla MSR, Nascimento ES. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Rev Bras Ciênc Farmac.* 2006;42(2):289-306.
7. Silva MIG, et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa 2006 dez; 16(4): 455-462
8. Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM, Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 2007; 17(1):114-40.
9. Carvalho PER, 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
10. Lorenzi H, Matos FJA. *Plantas Mediciniais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 512p.
11. Cleeland R, Squires E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Willians & Wilkins, 1991: 739-788.
12. Hadacek F, Greger, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparatibility of results and assay choice. **Phytochemical Analyses**. 2000; 11:137-147.

13. Ernst EJ, Roling EE, Petzold CR, Keele DJ, Klepser ME. *In Vitro* Activity of Micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: Microdilution, Time-Kill, and Postantifungal-Effect Studies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, 2002; 46(12):3846-3853
14. Pereira FO; Wanderley PA, Viana FAC, Lima RB, Sousa FB, Lima EO. Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex bor. **Brazilian Journal of Microbiology**,2011; 42(1): 233-242.
15. Sousa CR. **INFLUÊNCIA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE POLYGALA PANICULATA COMO COADJUVANTE NO TRATAMENTO DA DOENÇA PERIODONTAL INDUZIDA EM RATOS**. 2015; 66 f. TCC (Graduação) - Curso de Odontologia, Ufsc, Florianópolis
16. Assis C. Plantas medicinais na odontologia. **Rev. Bras. Odontol.**, Rio de Janeiro,2009 JAN; 66(1):72- 75.
17. Sartoratto A, Machado A, Delarmelina C, Figueira G, Duarte M, Rehder V. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004;35(4):275-280
18. Hafidh RR, Abdulmir AS, Vern LS, Bakar FA, Abas F, Jahanshri F, Sekawi Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **Open Microbiol J**. 2011; 5:96–106.
19. Haida, KS. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivos de ciências da saúde da UNIPAR** , 2007; 5(3):185-92
20. Obah IE, 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*, 2007; 6(4):809-813.
21. Bouzada, ML, Fabri RL, Nogueira M, Konno TU, Duarte GG, & Scio E. Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil. *Pharmaceutical biology*, 2009; 47(1):44-52.

Artigo III

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DA *Gossypium hirsutum* L. CONTRA CEPAS DE *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*

RESUMO

Plantas medicinais podem fornecer eficientes fármacos, com alta probabilidade de eficácia. A espécie *G. hirsutum* L. é amplamente encontrada no Nordeste, conhecida popularmente por algodoeiro, na fitoterapia, usa-se as folhas para confecção do chá. O presente estudo objetiva avaliar *in vitro* a ação antibacteriana do extrato da *G. hirsutum* L. contra *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. 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 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 foram 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 CIM₅₀ para *E. coli* e *K. pneumoniae* respectivamente CIM₅₀ 1024 µg/mL e maior que 1024 µg/mL e a CBM₅₀ da *E. coli* foi maior que 1024 µg/mL. Diante dos resultados obtidos pode-se afirmar que o extrato possui efeito moderado antibacteriano frente às cepas de *K. pneumoniae* e *E. coli*.

Palavras chave: Microbiologia. Farmacologia. Fitoterapia

ABSTRACT

Medicinal plants can provide convenient drugs with a high probability of sale. The species *G. hirsutum* is ended found in the Northeast, popularly known as cotton, in phytotherapy, is used as leaves for making tea.. The present study aims to evaluate the antibacterial action of the extract of *G. hirsutum* L. against *Pseudomonas Aeruginosa*. 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 MIC of 1024 µg / ml and MBC50 greater than 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 *K. pneumoniae* and *Escherichia coli*.

Key-words: Farmacology, Phytotherapy, Microbiology

INTRODUÇÃO

Plantas da Família Malvaceae, a qual pertence a *Gossypium hirsutum L.*, são usadas em comunidades ribeirinhas do município de Manacapuru, Amazonas, para Inflamações, pneumonia, cólica, tosse, gastrites. (VASQUEZ, MENDONÇA, NODA, 2014)

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. conhecida como algodão pertence à família Malvaceae é cultivada principalmente para fornecimento de matéria prima para fins industriais. 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 E MATOS, 2002).

Testes fitoquímicos na *Gossypium hirsutum L.* constataram a presença de metabólitos secundários como alcaloides, cumarinas, saponinas, flavanoides, triterpenos e taninos, que podem estar relacionados com a atividade antibacteriana frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. (MIRANDA et. al, 2013).

Klebsiella pneumoniae é um bacilo Gram-negativo da família Enterobacteriaceae, podendo ser encontrada em trato respiratório alto e trato

gastro-intestinal e urinário, causando pneumonia lobar e infecção urinária e septicemia. É uma das bactérias mais comumente encontradas em todo o mundo, sendo comum em casos de infecção do trato respiratório. Tem sido reconhecida como um patógeno pulmonar, desde a sua descoberta, há mais de 100 anos (KO, et al; 2002).

Carvalho, Rotbland e Nogueira, 2017 sugerem relação entre a pneumonia nosocomial, que tem como causa a *Klebsiella pneumoniae*, e a doença periodontal, uma vez que a infecção bacteriana em pacientes com periodontite pode favorecer a colonização da orofaringe, perpetuando a infecção através de mediadores inflamatórios e imunológicos, facilitando assim a colonização por patógenos bucais e respiratórios nos tecidos pulmonares.

A *Escherichia coli* é um bacilo Gram-negativo, anaeróbio facultativo, de oxidase negativa, catalase positiva, fermentador de lactose, sacarose e glicose, pode apresentar motilidade. Esta espécie pode ser patogênica ao homem e outros animais, ocasionando desde doenças no trato gastrointestinal até o óbito (YNGST et al., 2006; WELCH et al., 2006).

Dentre as bactérias gram-negativas envolvidas com infecções endodônticas destaca-se *Escherichia coli*, várias estruturas celulares desta bactéria, como flagelos e cápsulas e a molécula de lipopolissacarídeo (LPS), contribuem com a virulência da espécie. Essas bactérias podem alcançar a região intracanal principalmente quando a polpa dentária fica exposta à cavidade bucal por processos cariosos ou traumas coronários (TRABULSI; ALTERTHUM, 2015 ; LEONARDO; SILVA; NELSON FILHO, 2004).

Suas endotoxinas estão associadas a necroses pulpare de canais radiculares e lesões periapicais crônicas, devido a suas características de bactérias anaeróbias, especialmente gram-negativas (MAEKAWA et. al; 2011).

MATERIAIS E MÉTODO

Ensaio *in vitro*

Substâncias-teste

O extrato etanólico bruto da *Gossypium hirsutum* 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 bactérias Gram-negativas sendo elas: *Escherichia coli* ATCC 2536, *Escherichia coli* 101, *Escherichia coli* 102, *Escherichia coli* 103, , *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, *Klebsiela pneumoniae* ATCC, *Klebsiela pneumoniae* 33, *Klebsiela pneumoniae* 36, *Klebsiela pneumoniae* SN, estas, provenientes do Laboratório de Microbiologia da Unidade Acadêmica de Ciências Biloógicas do Centro de Saúde e Tecnologia Rural da Universidade Federal de Campina Grande, campus Patos, Paraíba.

Todas as cepas se mantiveram em meio *ágar Muller 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 *Ágar Muller Hinton* 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 foi 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, é adicionado 100 µL do meio líquido *ágar Mueller Hinton* duplamente concentrado. Em seguida, 100 µL da emulsão 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, obtiveram-se as concentrações de 1024, 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg/mL, de modo que na primeira linha da placa encontra-se a maior concentração e na última, a menor concentração. Por fim, foi adicionou-se 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, foi feito o controle positivo com o antibacteriano cloranfenicol. Um controle de micro-organismo foi realizado colocando-se nas cavidades 100 µL do mesmo ágar *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, realizou-se 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 ágar *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.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A concentração bactericida mínima (CBM) também foi determinada para as cepas de bactérias. Após a leitura da CIM em 48 horas, alíquotas de 20 µL foram retiradas de cada poço da placa de microtitulação que não apresentaram crescimento bacteriano, e transferidas para poços de uma nova placa de microtitulação contendo 100 µL de caldo *Mueller Hinton*, desprovidas de qualquer antimicrobiano. As placas inoculadas foram assepticamente fechadas e incubadas a 35 °C, e as CBMs foram registradas após 48 h. A CBM é

definida como a menor concentração do extrato que resultar em inibição visível do crescimento do micro-organismo (ERNST et al., 2002; PEREIRA et al., 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Testes fitoquímicos na *Gossypium hirsutum* L. constataram a presença de metabólitos secundários que podem estar relacionados com a atividade antibacteriana frente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. (MIRANDA et. al, 2013).

Segundo Sartoratto (2010), 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 *E. coli* e *K. pneumoniae*, considerado como moderado pois para ambas as bactérias, apresenta CIM₅₀ (Concentração Inibitória Mínima capaz de inibir 50% das cepas) maior que 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 *E. coli* e *K. pneumoniae*, nas concentrações estudadas, pois ambas CBM₅₀ (Concentração Bactericida Mínima capaz de inibir 50% das cepas) foram maior do que 1024 µg/mL frente às cepas.

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 nas tabelas

3 e 4. Observou-se que os resultados do extrato para as diversas cepas foi maior que 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 as tabelas 3 e 4, observa-se que nenhuma cepa obteve valores iguais ou menor que 1024 µg/ml. Constatando resultado bacteriostático negativo para as concentrações estudadas.

Tabela 3 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) em µg/mL do extrato etanólico bruto da *G. hirsutum* L. contra diferentes cepas de *E. coli*.

Cepas <i>E. coli</i>	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>ATCC 8539</i>	-	-
<i>Ec 101</i>	1024	-
<i>Ec 102</i>	-	-
<i>Ec 103</i>	-	-
<i>Ec 104</i>	1024	-

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

Fonte: autoria própria

Tabela 4 – Concentração inibitória mínima (CIM) e Concentração bactericida mínima (CBM) em µg/mL do extrato etanólico bruto da *G. hirsutum* L. contra diferentes cepas de *K. pneumoniae*.

Cepas <i>k pneumoniae</i>	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
<i>K. pneumoniae ATCC</i>	-	-
<i>K. pneumoniae 33</i>	-	-
<i>K. pneumoniae 36</i>	1024	-
<i>K. pneumoniae SN</i>	-	-

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

Fonte: autoria própria

Bouzada et. al., (2009), constatou resultado positivo de inibição da *K. pneumoniae* e da *E. coli* com o extrato da *G. hirsutum* L, em concentrações maior que 1000 µg/mL, concordando com o estudo.

Miranda et. al., (2013), constatou resultado negativo em diferentes gradações alcoolicas do extrato da *G. hirtutum* L., contra *E. coli*.

CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, observamos um potencial do extrato etanólico bruto da *G. hirsutum* L. contra a *Escherichia coli* e um potencial antibacteriano duvidoso contra a *Klebsiella pneumoniae*, 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.

REFERENCIAS

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

CARVALHO, P. A.; ROTBLAND, M.; NOGUEIRA, A. C. O. A doença periodontal como fator de risco para a pneumonia nosocomial. **International Journal of Science Dentistry**, Niterói, n.48, julho 2017

CLEELAND, R.; SQUIRES, E. Evaluation of new antimicrobials *in vitro* and in experimental animal infections. In: Lorian, V. M. D. **Antibiotics in Laboratory Medicine**. New York: Willians & Wilkins, p. 739-788, 1991.

ERNST, E. J.; ROLING, E. E.; PETZOLD, C. R.; KEELE, D. J.; KLEPSE, M. E. *In Vitro* Activity of Micafungin (FK-463) against *Candida* spp.: Microdilution, Time-Kill, and Postantifungal-Effect Studies. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 46, n. 12, p. 3846–3853, 2002

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

HAFIDH RR, ABDULAMIR AS, VERN LS, BAKAR FA, ABAS F, JAHANSHIRI F, SEKAWI Z. Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. **Open Microbiol J**, v.5, p.96–106, 2011

KO W.C. *et al.* Community-Acquired *Klebsiella pneumoniae* Bacteremia: Global Differences in Clinical Patterns. *Emerging Infectious Diseases*. v.8 n.2, p. 160-166, 2002.

LEONARDO, M.R.; SILVA R.A.B.; ASSED S.; NELSON-FILHO P. Importance of Bacterial endotoxin (LPS), **Endodontics. Journal Appl Oral Science**. V. 12, n.2, p.93, 2004

LORENZI, H.;MATOS, F.J.A. *Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. 512p.

MAEKAWA L.E.; *et al.* *In vitro* evaluation of the action of irrigating solutions associated with intracanal medications on *Escherichia coli* and its endotoxin in root canals. **J Appl Oral Sci** 2011; v. 19 n.2, p.106-12, 2011

MIRANDA, G. S; SANTANA, G S.; MACHADO, B. B. Avaliação da atividade antibacteriana das plantas *Gossypium hirsutum* L. (Algodão) e *Phyllanthus niruri* L. (quebra pedra) frente a *Staphylococcus Aureus*. **Anais Iii Simpoc**, Viçosa, v. 2, n. 1, p.53-58, dez. 2010

PEREIRA, F. O.; WANDERLEY, P. A.; VIANA, F. A. C.; LIMA, R. B.; SOUSA, F. B.; LIMA, E. O. Growth inhibition and morphological alterations of *Trichophyton rubrum* induced by essential oil from *Cymbopogon winterianus* Jowitt ex bor. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 42, n.1, p. 233-242, 2011.

Sartoratto A, Machado A, Delarmelina C, Figueira G, Duarte M, Rehder V. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*. 2004;35(4):275-280

TRABULSI, L.R.; ALTERTHUM, F.. **Microbiologia**. 6. ed. São Paulo: Atheneu, 2015.

VÁSQUEZ, S.P.F.; MENDONÇA, M.S.; NODA, S.N. Etnobotânica de plantas medicinais em comunidades ribeirinhas do Município de Manacapuru, Amazonas, Brasil. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 44, n. 4, p.457-472, maio 2014.

WELCH, R.A. et al. **The prokaryotes: A Handbook on the Biology of Bacteria**,: A Handbook on the Biology of Bacteria. 3. ed. New York: Springer-verlag New York, 2006. 6 v.

YNGST, S.L.; SAAD, M.D.; FELT, S.A. Classifying *Escherichia coli*. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, n.8, p.1297-1298, 2006

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos sugerem um eficaz efeito antibacteriano do extrato da *Gossypium hirsutum* L., destacando um efeito mais significativo contra as cepas de *Staphylococcus aureus*. Diante da constante evolução das bactérias e mecanismos de resistências aos antibióticos já existentes, resultados assim, entusiasma.

No entanto, sugere-se mais estudos nesta área, utilizando testes de toxicidade, por exemplo, para a completa elucidação.

ANEXOS

NORMAS DA REVISTA I – Scientia Plena

Diretrizes para Autores

A submissão deve estar em formato ".doc" (desde que não ultrapasse 2MB). O arquivo deve ser preparado de acordo com o modelo que consta no artigo-exemplo: http://scientiaplena.org.br/public/journals/1/Modelo_Artigo_2015.docx

Submissões que se apresentarem fora das normas da revista serão arquivadas. Recomendamos atenção na adequação do texto à essas normas, principalmente no que diz respeito ao estilo de citação (tipo Vancouver) e padronização das referências bibliográficas.

Um TUTORIAL com orientações para auxiliar o processo de submissão pode ser acessado em <http://www.scientiaplena.org.br/Tutorial.pdf>

São aceitos artigos em Português, Inglês ou Espanhol.

No ato de envio do artigo o autor deve obrigatoriamente:

1) Indicar a área do conhecimento, de acordo com a lista a seguir, e uma subárea, de preenchimento livre (campo "Comentários do Autor").

Grandes áreas do conhecimento:

Ciências Agrárias

Ciências Biológicas

Ciências da Saúde

Ciências Exatas e da Terra

Ciências Humanas, Letras e Artes

Ciências Sociais Aplicadas

Engenharias e Computação

Multidisciplinar

2) O nome completo de todos os autores deve ser cadastrado, **no momento da submissão**, de acordo com a ordem de autoria apresentada no trabalho (campo Metadados).

3) Indicar três nomes de avaliadores (nome completo, email e instituição em que trabalha) para a submissão (no campo "Comentários do Autor"). Os avaliadores indicados devem ser pesquisadores de reconhecida competência no tema do trabalho e que não tenham participado do desenvolvimento do artigo submetido. **Não indicar avaliadores da mesma instituição de origem do(s) autore(s) da submissão, visando evitar conflito de interesses. Editores da revista Scientia Plena não deverão ser indicados para a avaliação.**

Trabalhos que utilizaram seres humanos como objeto de estudo ou realizaram experimentação animal devem indicar no texto o número da aprovação do projeto pelos respectivos Comitês de Ética. Estudos que envolvem a aplicação de questionários devem informar se foi utilizado o "Termo de consentimento livre e esclarecido". Estudos com captura e/ou coleta de grupos biológicos devem indicar o número da licença de autorização para atividades com finalidade científica (IBAMA, SISBIO ou órgão estadual/municipal).

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

A contribuição é original e inédita, não sendo avaliada para publicação por outra revista.

Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word (desde que não ultrapassem 2MB). O arquivo de texto principal não deve ser submetido em .pdf.

O arquivo está preparado de acordo com os padrões de estilo e requisitos bibliográficos que constam no artigo-exemplo: http://scientiaplenu.org.br/public/journals/1/Modelo_Artigo_2015.docx

O nome completo de todos os autores deve ser cadastrado, no momento da submissão, de acordo com a ordem de autoria apresentada no trabalho (campo Metadados).

Indicar, no campo de Comentários ao Editor, área e subárea do conhecimento do trabalho.

Indicar, no campo de Comentários ao Editor, três possíveis avaliadores para a submissão (nome completo, email e instituição em que trabalha).

Declaração de Direito Autoral

Autores que publicam nesta revista concordam com os seguintes termos:

Autores mantêm os direitos autorais e concedem à revista o direito de primeira publicação, com o trabalho simultaneamente licenciado sob a Licença Creative Commons Attribution que permite o compartilhamento do trabalho com reconhecimento da autoria e publicação inicial nesta revista.

Autores têm autorização para assumir contratos adicionais separadamente, para distribuição não-exclusiva da versão do trabalho publicada nesta revista (ex.: publicar em repositório institucional ou como capítulo de livro), com reconhecimento de autoria e publicação inicial nesta revista.

Autores têm permissão e são estimulados a publicar e distribuir seu trabalho online (ex.: em repositórios institucionais ou na sua página pessoal) a qualquer

ponto antes ou durante o processo editorial, já que isso pode gerar alterações produtivas, bem como aumentar o impacto e a citação do trabalho publicado.

Política de Privacidade

Os nomes e endereços informados nesta revista serão usados exclusivamente para os serviços prestados por esta publicação, não sendo disponibilizados para outras finalidades ou a terceiros.

ANEXO II- Normas da revista UNIABEU

Diretrizes para Autores

Submissão eletrônica

Os textos submetidos deverão ser inéditos e não poderão estar sob avaliação em outro periódico.

1- A submissão será feita online. O texto não deverá conter informação sobre a autoria. A identificação e a filiação institucional serão feitas no momento da submissão do artigo ou resenha.

2- O texto deverá ser editado no MS-Word, com espaçamento de 1,5 cm, entrada de parágrafo de 1,5 cm, recuo de 2 cm nas citações e ser formatado em A4 e com margens inferior, superior, direita e esquerda de 2,5 cm. As páginas deverão ser numeradas ao alto, à direita.

3- Os artigos deverão ter um mínimo de oito e máximo de quinze laudas (incluindo bibliografia e notas explicativas), digitadas em Arial 12 para corpo de texto e 11 para citações em parágrafo próprio, em espaço 1,5 para corpo de texto e espaço simples para citações em parágrafo próprio.

4- Todos os textos deverão estar acompanhados de um resumo (máximo de 200 palavras), 3 palavras-chave, abstract, 3 key words (precedendo o texto) e referências bibliográficas.

5- O título deverá estar em fonte Arial 14, centralizado. Subtítulos: Não iniciar uma nova página a cada subtítulo; Os títulos são diferenciados graficamente entre seções de hierarquia diferentes e iguais quando de mesma hierarquia; Deve seguir uma numeração seqüencial.

6- Para ênfase ou destaque usar-se-á aspas duplas, reservando-se o itálico para títulos de obras, palavras ou expressões em outros idiomas citadas no texto.

7- As citações bibliográficas serão indicadas no corpo do texto, no sistema de chamada autor-data, entre parênteses, com as seguintes informações:

sobrenome do autor em caixa alta; vírgula; data da publicação; vírgula; abreviatura de página (p.) e o número desta. (Ex: SILVA, 1992, p. 3-23)

8- As notas de rodapé deverão ser restritas ao mínimo indispensável.

9- As referências bibliográficas deverão ser apresentadas ao final do texto, antes das notas explicativas, obedecendo as normas da ABNT (NBR-6023).

Livro: sobrenome do autor, título do livro (em itálico), local de publicação, editora, data.

BERGSON, Henri. *Matéria e memória*. São Paulo: Martins Fontes, 1999.

Artigo: nome do autor, título do artigo, nome do periódico (itálico), local de publicação, editora ou entidade responsável pela publicação, volume e número do periódico, números inicial e final das páginas do artigo, data.

COSTA, A.F.C. da Estrutura da produção editorial dos periódicos biomédicos brasileiros. *Trans-in- formação*, Campinas, v. 1, n.1, p. 81-104, jan./abr. 1989.

10- As ilustrações deverão ter a qualidade, necessária para uma boa reprodução gráfica. O formato do arquivo de imagem deverá ser jpg. As imagens deverão ser identificadas, com título ou legenda, e designadas, no texto, de forma abreviada, como figura (Fig. 1, Fig. 2 etc).

11- As resenhas deverão seguir as mesmas normas para artigos, apresentando a referência completa da obra resenhada em parágrafo justificado, ao invés do título. O texto deverá ter entre 3 e 5 laudas.

12- Todos os trabalhos encaminhados para publicação serão submetidos à apreciação dos Conselhos Editorial e Consultivo, que dispõem de plena autoridade para decidir sobre a conveniência ou não de sua publicação, podendo sugerir alterações.

13- A descon sideração das normas implicará a não aceitação do texto.

14- A aprovação de um trabalho não implica sua publicação no número imediatamente a seguir.

15- Serão feitas chamadas para números especiais ou comemorativos.

16- Excepcionalmente, poderá ser feita a publicação de dois números em um mesmo quadrimestre.

17- O número de artigos publicados não excederá a 25 por número.

18- Textos de estudantes de pós-graduação serão considerados se elaborados em coautoria com orientador doutor.

x

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em "Comentários ao Editor".

Os arquivos para submissão estão em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF (desde que não ultrapassem 2MB)

URLs para as referências foram informadas quando necessário.

O texto está em espaço 1,5; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços URL); as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento, como anexos.

O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em [Diretrizes para Autores](#), na seção Sobre a Revista.

A identificação de autoria do trabalho foi removida do arquivo e da opção Propriedades no Word, garantindo desta forma o critério de sigilo da revista, caso submetido para avaliação por pares (ex.: artigos), conforme instruções disponíveis em [Assegurando a Avaliação Cega por Pares](#).

ANEXO III – Normas da revista UNINGÁ

Condições para submissão

Como parte do processo de submissão, os autores são obrigados a verificar a conformidade da submissão em relação a todos os itens listados a seguir. As submissões que não estiverem de acordo com as normas serão devolvidas aos autores.

A contribuição é original e inédita, e não está sendo avaliada para publicação por outra revista; caso contrário, deve-se justificar em “Comentários ao editor”

O arquivo da submissão está em formato Microsoft Word, OpenOffice ou RTF.

URLs para as referências foram informados quando possível

O texto está em espaço simples; usa uma fonte de 12-pontos; emprega itálico em vez de sublinhado (exceto em endereços de URL); as figuras e tabelas estão inseridas no texto, não no final do documento na forma de anexos.

O texto segue os padrões de estilo e requisitos bibliográficos descritos em “Diretrizes para Autores”, na página Sobre a Revista.

O documento do word a ser enviado esta SEM NENHUMA identificação dos autores, como nome, instituição, endereço, etc.

O título do arquivo a ser enviado não contém seu nome ou sobrenome, nem nome de sua instituição, ou seja, nada que permita a identificação dos autores.

Diretrizes para Autores

Normas ABNT (citações e referências)

Enviar arquivo no word, contendo título em português e inglês, resumo e abstract, e o texto do corpo do artigo.

As figuras, tabelas, gráficos, legendas e referências deverão incluídas no arquivo do word.

Neste arquivo do word que será feito upload, não adicionar nenhuma informação dos autores (nome, qualificação, endereço, e-mail)

ATENÇÃO: enviar o artigo sem nenhuma identificação dos autores!