

## Viabilidade de extratos etanólicos de folhas de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) no controle de bactérias de interesse médico

Luís Fernando Albarello Gellen<sup>1</sup>, Aline Torquato Tavares<sup>2</sup>, Valéria Gomes Momenté<sup>3</sup>, Tiago Alves Ferreira<sup>4</sup>, Renato Sales Coelho<sup>5</sup>, Ildon Rodrigues Nascimento<sup>6</sup>

1. Biomédico, Doutorando em Biodiversidade e Biotecnologia na Universidade Federal do Tocantins. Professor da Ulbra (Centro Universitário Luterano de Palmas, Brasil).

[gellenbiomedico@hotmail.com](mailto:gellenbiomedico@hotmail.com)

<http://lattes.cnpq.br/4741560970986943>

<http://orcid.org/0000-0002-8628-1768>

2. Agrônoma, Doutora em Produção Vegetal, Pesquisadora PNPd no Programa de Pós-Graduação em Produção Vegetal (Universidade Federal do Tocantins, campus de Gurupi-Brasil)

[alinet4t@hotmail.com](mailto:alinet4t@hotmail.com)

<http://lattes.cnpq.br/6091434694846288>

<http://orcid.org/0000-0001-6621-5328>

3. Agrônoma, Doutora, Professora na Universidade Federal do Tocantins, campus de Palmas-TO, Brasil.

[valeria@uft.edu.br](mailto:valeria@uft.edu.br)

<http://lattes.cnpq.br/2873601834933100>

<http://orcid.org/0000-0001-9769-2207>

4. Agrônomo, Doutor em Produção Vegetal (Universidade Federal do Tocantins) Tutor Presencial do Serviço Nacional de Aprendizagem Rural

[tiagoferreira.agro@gmail.com](mailto:tiagoferreira.agro@gmail.com)

<http://lattes.cnpq.br/6854480151506241>

<http://orcid.org/0000-0003-0553-5859>

5. Mestrando em Produção Vegetal (Universidade Federal do Tocantins, Brasil).

[renatosales0@gmail.com](mailto:renatosales0@gmail.com)

<http://lattes.cnpq.br/2814183977602749>

Professor da Universidade Federal do Tocantins, Brasil.

[ildon@uft.edu.br](mailto:ildon@uft.edu.br)

<http://lattes.cnpq.br/3059256712427872>

<http://orcid.org/0000-0002-0439-6490>

### RESUMO

Inúmeros esforços têm sido dirigidos para comprovar o uso das plantas quanto ao seu potencial no controle de bactérias. O trabalho teve como objetivo avaliar o potencial inibitório e atividade bactericida do extrato alcoólico de folhas de *Solanum lycocarpum* St. Hill. e a citotoxicidade de concentrações de extrato foliar de lobeira em linhagens mielocíticas THP-1. Foi determinada a atividade inibitória mínima e máxima (CIMM), curva cinética com adição de concentrações variadas de extrato de lobeira e teste de disco-difusão em ágar em cepas de *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *E. pyogenes*. As cepas gram-positivas (*S. aureus* e *S. pyogenes*) são mais sensíveis ao extrato de lobeira do que as gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*). As concentrações inibitórias mínimas para as cepas de *P. aeruginosa* e *E. coli* ocorreram em concentrações mais elevadas que nas bactérias gram-positivas testadas. Os extratos de folhas de lobeira apresentam citotoxicidade a células humanas em concentrações maiores. Extrato das folhas de lobeira demonstra atividade inibitória no teste de disco-difusão, no entanto são requeridos mais trabalhos para testar sua viabilidade na formulação de um possível medicamento.

**Palavras-chaves:** *Solanum lycocarpum*, antimicrobiano, viabilidade celular.

### Viability extracts ethanol of leaves lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) in medical interest bacteria control

### ABSTRACT

Numerous efforts have been directed to prove the use of plants for their potential to control bacteria. The objective of this work was to evaluate the inhibitory potential and bactericidal activity of *Solanum lycocarpum* St. Hill leaf alcohol extract and cytotoxicity of wolf leaf extract concentrations in THP-1 myelocytic strains. Minimum and maximum inhibitory activity (MIC), kinetic curve with varying concentrations of lobeira extract and disk diffusion test on *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* and *E. pyogenes* strains were determined. Gram-positive strains (*S. aureus* and *S. pyogenes*) are more sensitive to lobeira extract than gram-negative strains (*E. coli* and *P. aeruginosa*). The minimum inhibitory concentrations for *P. aeruginosa* and *E. coli* strains occurred at higher concentrations than the gram-positive bacteria tested. Werewolf leaf extracts present cytotoxicity to human cells at higher concentrations. Extract of wolfberry leaves demonstrates inhibitory activity in the disc diffusion test, however further work is required to test its viability in formulating a possible drug.

**Keywords:** *Solanum lycocarpum*; antimicrobial; cell viability.

### Introdução

O uso de plantas para fins terapêuticos representa uma tradição milenar em diferentes culturas (Maias, Incas e tribos africanas) e o Brasil possui milhares de espécies ainda não catalogadas (CARTAXO et al., 2010). Várias plantas do cerrado têm sido eficazes para o tratamento de muitas infecções, provocadas por microrganismos (FERRONATO et al., 2007; SALVAGNINI et al., 2008).

Predominante no cerrado brasileiro, a *Solanum lycocarpum* St. Hil. ou lobeira, como é conhecida pela população do norte e nordeste do país, pertence à família Solanaceae. É uma árvore de porte arbustivo, sua altura varia de 2-6 metros de altura, seus frutos são verdes, globosos com diâmetro que varia de 8-12 cm, de sua polpa amarela é rica em amido (SILVA FILHO et al., 2012; AGRA et al., 2009; CINTRA et al., 2008).

Produtora de metabólitos secundários de grande importân-

cia para a indústria farmacêutica, estes com aplicabilidade em tratamentos hormonais como precursores de androgênios (solamina e solamargina) ou como antioxidantes no combate ao envelhecimento precoce (taninos e flavanoides) (AMAL et al., 2009).

Além dos metabólitos secundários, a lobeira contém outras substâncias com potencial medicinal, como é o caso do amido presente nos frutos. Esse apresenta potenciais hipoglicemiantes, combatendo diabetes tipo II, obesidade e problemas ligados a elevados níveis de colesterol. Outros bioativos presentes na lobeira tem atividade diurética, anti-espasmolítica, sedativa, antifúngica, antiparasitária e atividades anti-inflamatórias (ALONSO-CASTRO et al., 2012; HERNÁNDEZ-ORTEGA et al., 2012; AL-ASHAAL, 2010; MORENO-SALAZAR et al., 2008).

Como objetivos, esse trabalho propõe avaliar o potencial inibitório e atividade bactericida do extrato alcoólico de folhas de

*Solanum lycocarpum* St. Hill. em cepas padrão de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Escherichia coli* ATCC 35218 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e avaliar a citotoxicidade de concentrações de extrato foliar de lobeira em linhagens mielocíticas THP-1.

## Material e Métodos

Os experimentos foram realizados nos Laboratórios de Microbiologia e Vacinologia da Universidade Federal do Tocantins (UFT), Campus Universitário de Gurupi. As folhas de *S. lycocarpum* St. Hill foram coletadas nos municípios e coordenadas descritas no Quadro 1.

**Quadro 1.** Locais de coleta das folhas de *S. lycocarpum* St. Hill. / **Chart 1.** Leaf collecting locations of *S. lycocarpum* St. Hill.

Município	Coordenadas
Cristalândia-TO	10°34'49.82"S / 49°05'37.43"O
	10°34'51.75"S / 49°05'33.56"O
	10°34'49.98"S / 49°05'28.86"O
	10°34'49.74"S / 49°05'30.07"O
	10°34'53.95"S / 49°05'22.60"O
	10°34'50.04"S / 49°05'31.33"O
	10°34'48.16"S / 49°05'21.53"O
	10°34'48.61"S / 49°05'18.66"O
	10°34'49.20"S / 49°05'19.99"O
10°34'47.67"S / 49°05'08.52"O	
Pium-TO	10°27'54.63"S / 49°10'59.52"O
	10°27'53.88"S / 49°11'11.21"O
	10°27'49.28"S / 49°11'00.95"O
Correntina-BA e Barreiras-BA	13°16'50.00"S / 44°39'29.50"O
	13°16'45.04"S / 44°39'30.67"O
	13°13'37.60"S / 44°39'17.36"O
	13°11'10.40"S / 44°37'23.86"O
	13°11'10.10"S / 44°37'27.57"O

Em cada local foram coletadas folhas da região mediana das plantas, após as coletas as folhas foram armazenadas em sacos plásticos e identificadas. Em laboratório, as folhas foram submetidas ao processo de lavagem com hipoclorito a 3% e água corrente e em seguida submetidas a secagem em estufa de secagem com entrada de ar forçada a 37°C até atingirem peso constante.

Com o material foliar desidratado, as folhas foram trituradas em liquidificador industrial com o intuito de aumentar a penetração do solvente ao soluto. Em seguida para formar a solução de extração, foi utilizada a proporção de 40/60, onde 400 gramas de pulverizados foram adicionados a 600 mL de etanol absoluto.

Posteriormente a solução foi submetida a ambiente ausente de luz pelo período de 24 horas a 25°C, sob agitação contínua em shaker orbital a 250 rpm. Concluída esta etapa de descanso da solução, foi submetida a procedimentos de filtração, iniciando por filtração a vácuo seguida de filtração em filtro miliporo (Milliporo K18-230) com vazão do poro de 0,22 µm.

Após os processos de filtração o etanol presente na solução foi extraído por processo de evaporação em evaporador rotativo (Quimis -Q344B) a 60°C e o resíduo resultante foi re-extraído utilizando o fluxo de ar da capela de fluxo laminar durante 24 h, resultando em apenas o concentrado foliar bruto de *S. lycocarpum*.

Para os testes de atividade antimicrobiana foram utilizadas cepas de duas bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615) e duas bactérias gram-negativas (*Escherichia coli* ATCC 35218 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853).

As concentrações inibitória mínima e máxima foram determinadas através da metodologia de micropoços em meio sólido

do Muller Hilton (NCCLS, 2008). Para isso, as colônias de cada cepa foram fortalecidas previamente por um período de 48 horas a 37 °C em meio BHI. Após esse processo uma alíquota foi suspendida e ajustada para a turvação de 0,5 da Escala de McFarland (LENETTE et al., 1987).

Em meio Muller Hilton foram semeadas as cepas pelo método de esgotamento de alça, por meio de perfurações no meio de cultura com cerca de 6mm de diâmetro. Em cada orifício foram adicionadas concentrações do extrato, que foram de 0 a 200 mg, com diferença entre as doses de 10 mg. Posteriormente incubadas por um período de 24 horas a 37°C. Para determinar a concentração inibitória mínima e máxima foi utilizada a metodologia de Silva et al. (2009), sendo adaptada com o seguinte parâmetro. A concentração inibitória mínima será considerada a partir da menor concentração testada, isto quando ela apresentar halo superior a 10 mm, a máxima quando a maior concentração de extrato apresentar uma progressão menor que 3 mm em comparação a concentração anterior.

A cinética bacteriana com adição das concentrações do extrato foliar de *S. lycocarpum* obtidas no teste de CIMM é um teste adaptado da curva cinética bacteriana e se baseia na metodologia de Peyret et al. (1990).

Determinadas as curvas cinéticas de todos os microrganismos, seus pontos e tempo de estabilidade nas fases lag, exponencial, estacionária e declínio, utilizou-se os valores de atividade inibitória mínima e máxima das concentrações do teste CIMM, e foi feito novamente o teste da curva cinética de crescimento, contudo utilizando as concentrações de extrato de *S. lycocarpum* St. Hill, que foram adicionadas ao meio BHI líquido contendo as bactérias.

Nesta metodologia haverá um padrão para as concentrações dos extratos, isto para anular a absorbância gerada pelo extrato e permitir observar apenas a multiplicação bacteriana.

Os testes de disco-difusão foram realizados segundo NCCLS (NCCLS, 2008). Com auxílio de uma alça bacteriológica foram retiradas alíquotas bacterianas fortificadas, estas adicionadas em soro fisiológico estéril e ajustadas para turvação de 0,5 na escala de McFarland (LENETTE et al., 1987).

Os discos foram confeccionados de acordo com as concentrações do teste de CIMM, utilizando como controle negativo um disco com apenas água. Os controles positivos foram determinados de acordo com cada descrição contida no NCCLS para cada estirpe bacteriana. Para *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 foi utilizada a gentamicina 10 mg; *Escherichia coli* ATCC 35218 a ampicilina com sulbactam 20 mg; *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615 utilizou a penicilina G 10 mg e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 a amoxicilina com ácido clavulânico 30 mg. Caso ocorra resistência bacteriana, o controle positivo é alterado segundo as especificações do NCCLS (2008).

Todos discos foram pressionados suavemente contra o meio de cultura e as distâncias entre os discos foi de 30mm e da margem da placa de 15mm, para assim impedir a superposição de halos de inibição.

As placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após este período foi realizada a leitura com auxílio de um paquímetro. Cada concentração foi avaliada em 10 repetições para todas as cepas bacterianas, para assim obter-se uma média do valor de inibição percentual.

O teste de viabilidade celular utilizando linhagem ATCC THP-1 seguiu a metodologia descrita por MOSMANN (1983).

Para manutenção da linhagem celular THP-1 foi utilizado meio de cultura RPMI, suplementado com soro fetal bovino (10%), antibióticos (10,000 U/mL de penicilina e 10mg/L de estreptomina) e bicarbonato (0,6 g). As células foram incubadas em atmosfera úmida de 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°.

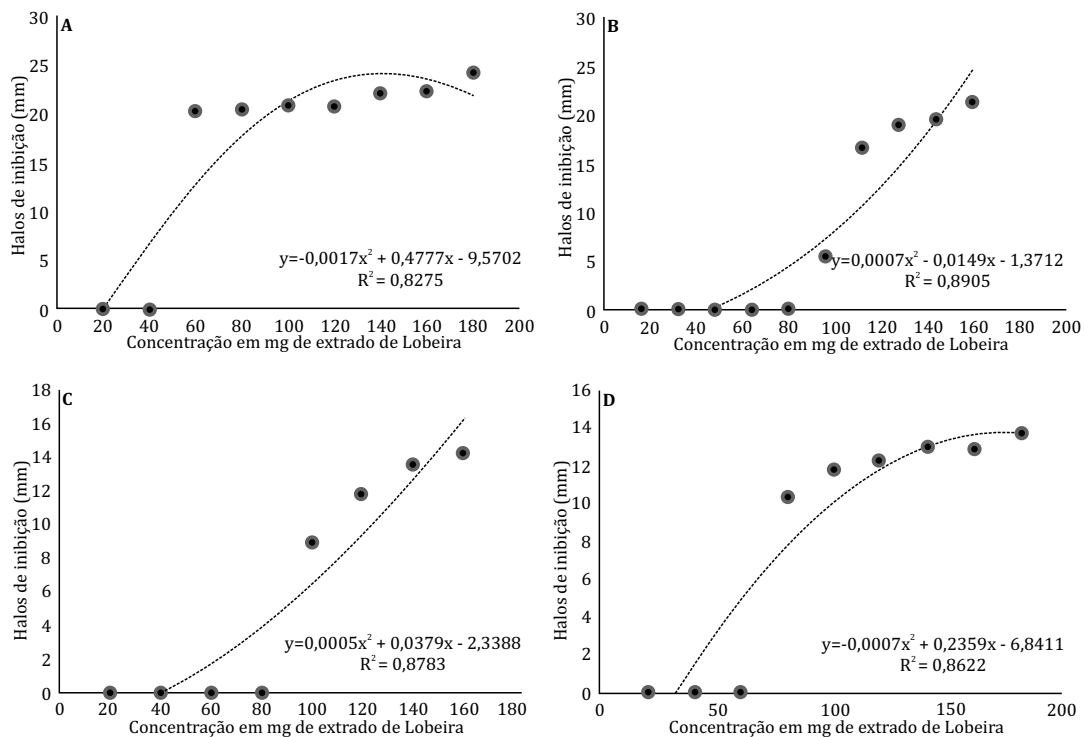
As células THP-1 foram contadas em câmara de Neubauer, para assim determinar a quantidade específica de células pipetadas em cada poço. Para o teste determinou-se a quantidade de  $1 \times 10^4$  células para cada poço. A quantidade de reagentes para cada poço foi a seguinte: 50 mL da solução celular de THP-1 para 1 mL de meio, adicionando as concentrações do extrato a serem testadas. Incubar em estufa de  $\text{CO}_2$  na concentração de 5% a  $37^\circ\text{C}$  por um período de 48 horas, após este período pipeta-se o reagente MTT (100  $\mu\text{L}$ ), aguardando 4 horas para realizar a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Para o teste de viabilidade, além do controle normal do teste (células THP-1 mais Meio), foi necessário um controle de subtração, isto pelo fato do extrato apresentar coloração intensa. Neste caso o controle será o extrato mais meio, para que seja eliminada a absorvância do extrato.

A absorvância real do teste foi obtida pela relação entre a absorvância do teste e a absorvância do extrato controle

$$\text{Abs. Real do Teste} = \frac{\text{Abs. Teste}}{\text{Abs. Extrato Controle}}$$

Após obtidas as absorvâncias reais, estas foram comparadas a absorvância padrão do teste, onde, se as absorvâncias dos testes forem maiores que a do padrão, demonstrando que o extrato não é viável para células humanas, sendo assim considerado citotóxico.



**Figura 1.** Concentração inibitória mínima e máxima para *S. aureus* (A), *P. aeruginosa* (B), *E. coli* (C) e *S. pyogenes* (D) em função de extrato de lobeira, apresentado em gráfico de dispersão. / **Figure 1.** Maximum and minimum inhibitory concentration for *S. aureus* (A), *P. aeruginosa* (B), *E. coli* (C) and *S. pyogenes* (D) lobeira extract function shown in scatterplot.

Utilizando os valores de atividade inibitória mínima e máxima das concentrações do teste CIMM, realizou-se novamente o teste da curva cinética de crescimento, contudo utilizando as concentrações de extrato de *S. lycocarpum* St. Hill., estas adicionadas ao meio BHI líquido contendo as bactérias.

Observando a Figura 2, podemos concluir que todas as cepas entram na fase lag nos 50 minutos após início do inóculo, a fase exponencial demora exatamente 150 minutos e aos 200 minutos de teste as cepas bacterianas entram em fase estacionária, durando um período de 150 minutos, ou seja aos 350 minutos do teste as cepas bacterianas entram em fase de declínio.

Para as variáveis analisadas foram ajustados modelos regressivos da distribuição dos dados em função da concentração do extrato ou do tempo de avaliação.

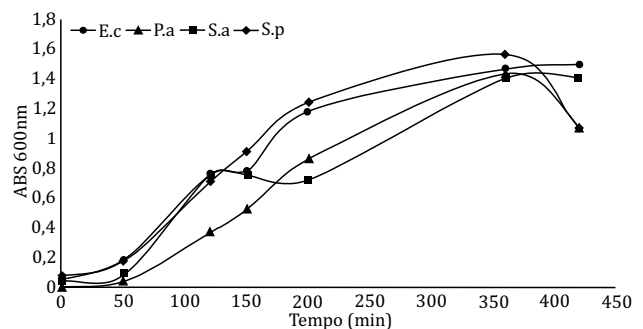
## Resultados

Podemos observar que as cepas gram-positivas (*S. aureus* e *S. pyogenes*) apresentaram-se mais sensíveis ao extrato de lobeira que as gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*), ou seja, o extrato apresentou eficiência em concentrações menores na CIMin. (Tabela 1).

**Tabela 1.** Teste de concentração inibitória mínima e máxima (CIMM) em cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* e *S. pyogenes*. **Table 1.** Test maximum and minimum inhibitory concentration (CIMM) in strains of *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli* and *S. pyogenes*.

CIMM: Concentração inibitória Mínima e Máxima			
Bactéria	Concentração de Extrato (mg)	CIMin (mm)	CIMax (mm)
<i>S. aureus</i>	60 - 180	19,5	25,4
<i>P. aeruginosa</i>	120-200	9	21
<i>E. coli</i>	100-160	10	14
<i>S. pyogenes</i>	80-180	10,2	13,5

As concentrações inibitórias mínimas (CIMin) iniciaram nas concentrações 60, 80, 100 e 120 mg e posteriormente as suas concentrações inibitórias máximas (CIMax) foram de 180 mg para as cepas de *S. aureus*, *S. pyogenes*, 160 mg para *E. coli* e 200mg para *P. aeruginosa* (Figura 1).



**Figura 2.** Curva cinética bacteriana de cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *E. pyogenes* e *P. aeruginosa* em função da determinação das fases lag, exponencial, estacionária e de declínio de cada cepa bacteriana. / **Figure 2.** Bacterial kinetic curve of strains of *E. coli*, *S. aureus*, *E. pyogenes* and *P. aeruginosa* as a function of determination of the lag, exponential, stationary and decline phases of each bacterial strain.

Determinada curva de crescimento bacteriano, seus tempos de entrada e saída das fases lag, exponencial, estacionária e de declínio, podemos aplicar os extratos cujo os valores foram coletados no teste de CIMM, deste modo traçamos uma curva cinética bacteriana com extratos de lobeira e observamos o potencial antibacteriano de cada concentração, em cada fase da curva bacteriana.

Observando as curvas cinéticas de cada cepa bacteriana (Figura 3), identificou-se que as concentrações do extrato de folhas de lobeira aceleraram a curva cinética, isto foi observado pelo tempo de entrada na fase de declínio das bactérias, que foi de 250 minutos de teste. Com a adição dos extratos esta fase na curva teve início aos 200 minutos na curva de *P. aeruginosa* e *S. pyogenes*, *S. aureus* a fase de declínio foi aos exatos 210 minutos e 225 minutos para a cepa de *E. coli*.

Outro parâmetro observado na curva com os extratos na figura 3, foi a redução da taxa de multiplicação bacteriana, conforme podemos observar na progressão do gráfico, em comparação com a Figura 2.

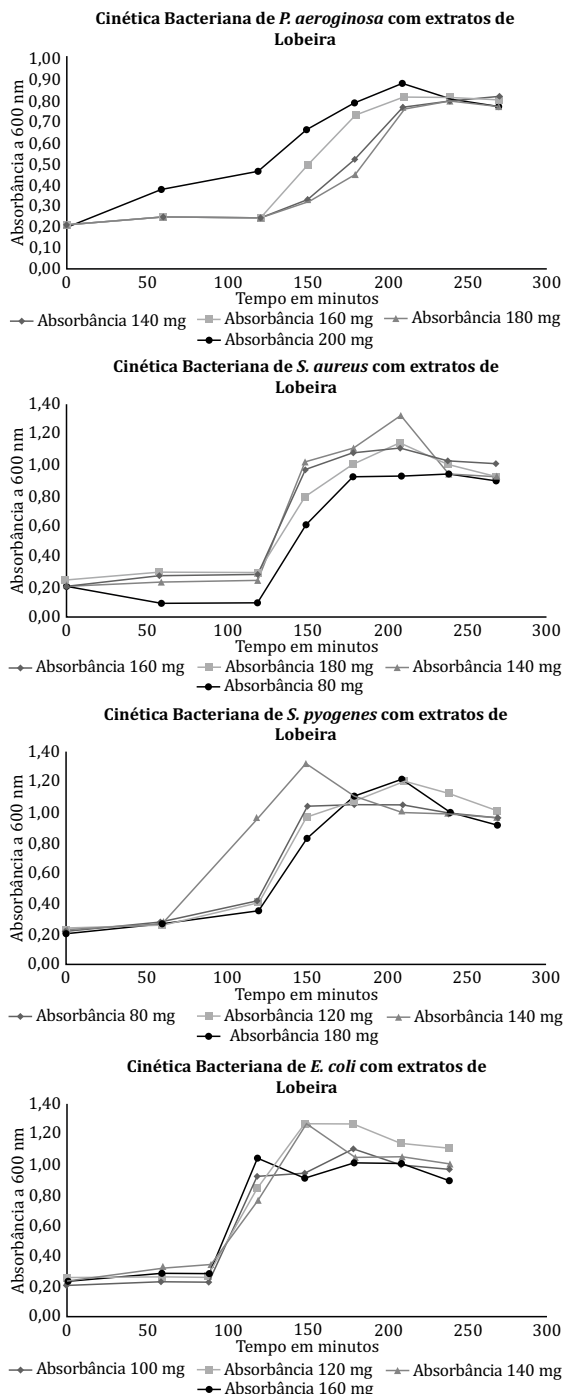


Figura 3. Curvas cinéticas de *P. aeruginosa*, *S. pyogenes*, *S. aureus* e *E. coli*, utilizando concentrações de extrato de folhas de lobeira. / Figure 3. Kinetic curves of *P. aeruginosa*, *S. pyogenes*, *S. aureus* and *E. coli*, using concentrations of lobe leaf extract.

Na curva com cepas de *P. aeruginosa* temos uma taxa de absorvância de 1,43 na curva cinética sem extratos, ao adicionar os extratos os valores das absorvâncias foram de 0,78 com extrato a 140 mg, 0,82 com extrato na concentração de 160 mg, 0,77 a 180 mg e 0,88 na concentração de 200 mg de extrato de lobeira. Nas cepas de *S. aureus* observou-se a mesma redução da taxa de multiplicação bacteriana, onde 1,41 foi a ápice de concentração celular medidas pela absorvância. Com a adição dos extratos este valor reduziu para 0,93 com a concentração de 80 mg, 1,33 a 140 mg, 1,11 a 160 mg e 1,14 a 180 mg de extrato de lobeira

Com as cepas de *S. pyogenes* sua absorvância na curva normal apresentou 1,57 reduzindo para 1,24 a 80 mg, 1,30 a 140 e 1,22 a 180 mg e 1,20 na concentração de 120 mg de extrato de lobeira. A mesma redução foi observada nas cepas de *E. coli*, onde suas absorvâncias no ápice de multiplicação bacteriana foram de 1,10 em 100 mg, 1,27 em 120 e 140 mg e 1,05 a 160 mg de extrato de lobeira.

O teste de disco difusão determinará a atividade antimicrobiana do extrato foliar de lobeira e se existe realmente fenômeno de resistência das cepas em teste perante as concentrações do extrato testadas.

Na Figura 4, avaliou-se o potencial antimicrobiano partindo de uma média, valor este obtido com o resultado de dez repetições.

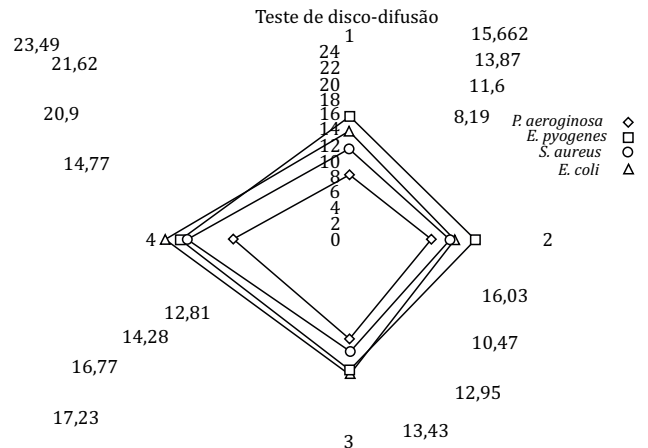


Figura 4. Médias dos testes de disco-difusão, utilizando as concentrações do teste CIMM, sendo que para *E. coli* (100, 120, 140 e 160 mg), *S. aureus* (80, 140, 160 e 180 mg), *P. aeruginosa* (140, 160, 180 e 200 mg) e *E. pyogenes* (80, 140, 160 e 180 mg). / Figure 4. The mean values of the diffusion-disc tests, using concentrations of the CIMM test, were: *E. coli* (100, 120, 140 e 160 mg), *S. aureus* (80, 140, 160 and 180 mg), *P. aeruginosa* (140, 160, 180 and 200 mg) and *E. pyogenes* (80, 140, 160 and 180 mg).

As médias da atividade antimicrobiana dos extratos variaram de acordo com a concentração e a cepa bacteriana, para a cepa de *E. coli* as concentrações testadas foram 100, 120, 140 e 160 mg, respectivamente e suas médias foram 8,19 mm, 10,47mm, 12,81 mm e 14,77 mm, demonstrando assim que folhas de lobeira tem atividade antimicrobiana perante cepas de *E. coli*.

Com as cepas de *P. aeruginosa* a concentração foi a maior utilizada, isto determinado pelo teste de CIMM. As médias geradas de acordo com os resultados foram de 15,6 mm na concentração de 140 mg, 16,03 mm em 160 mg, 16,77 mm em 180 mg e 21,62 mm em 200 mg de extrato foliar de lobeira. A atividade antimicrobiana gerada pelo extrato perante ensaios com cepa de *S. pyogenes* gerou as seguintes médias de halo em suas respectivas concentrações, 11,6 mm na concentração de 80 mg, 12,95 mm em 140 mg, 14,28 mm em 160 mg e 20,9 mm em 180 mg de extrato foliar de lobeira.

No material vegetal avaliado nesse experimento foi observada a atividade antimicrobiana sobre cepas de *S. aureus*, suas médias de halo foram de 13,87 mm a 80 mg, 13,43 mm a 140 mg, 17,23 mm a 160 mg e 23,49 mm a 180 mg de concentração de extrato foliar de lobeira.

Todos os controles positivos apresentaram os halos condizentes com as informações contidas no NCCLS, sendo estas as seguintes: Gentamicina 10 mg (entre 16 – 21 mm), Ampicilina com sulbactam 20 mg (19-24 mm), Penicilina G 10 mg (acima de 16 mm) e Amoxicilina + ácido clavulânico 30 mg (28 -36 mm).

Utilizando células mielomonocíticas THP-1 ATCC foi possível evidenciar que o extrato etanólico bruto apresenta citotoxicidade a partir de 100 mg de extrato (Tabela 3), onde os valores de absorvância foram próximo a absorvância padrão.

**Tabela 3.** Teste de viabilidade celular e contendo, valores e formula do fator de correção do extrato.  
/ **Table 3.** Cell viability test and containing values and formula extract correction factor.

Concentração (mg)	Absorvância Corrigida	Padrão	Abs. Extrato Controle
60	0,09	0,30	0,81
80	0,19		
100	0,34		
120	0,41		
140	0,60		
160	0,72		
180	0,84		
200	0,87		

## Discussão

Morfológicamente os resultados da Tabela 1 estão associados a espessura da parede celular das bactérias gram-negativas, esta considerada mais espessa tendo o seu fator de sobrevivência maior quando comparada as gram-positivas, sendo necessária uma concentração maior na antibioticoterapia (TORTORA et al., 2011; MURRAY et al., 2009).

As CIMin para as cepas de *P. aeruginosa* e *E. coli* ocorreram em concentrações mais elevadas que nas bactérias gram-positivas envolvidas no teste. Este evento está ligado a espessura da membrana das bactérias gram-negativas que dificulta a interação e a toxicidade de substâncias com potencial antimicrobiano, contudo não impede sua atividade, isto depende inteiramente da concentração administrada (TORTORA et al., 2011).

Silva (2010) determinou em seu experimento que nos testes de CIM (Concentração inibitória mínima) não houve inibição para cepas de *E. coli* no seu teste, quando os ensaios acima demonstram que acima de 100 mg existe atividade antimicrobiana (Figura 3), o mesmo ocorre com as cepas de *P. aeruginosa* que mesmo apresentando a necessidade e aumentar as concentrações testadas houve sensibilidade da bactéria ao extrato a partir de 120 mg.

Contudo Silva (2010) observou atividade antimicrobiana dos extratos foliares em outros testes de atividade antimicrobiana, como os testes de disco difusão e o de micro poços, entretanto Scarpel et al. (2004) realizando testes de atividade antimicrobiana com extratos de lobeira não obtiveram nenhum resultado de sensibilidade para as cepas *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Entretanto, deve-se levar em conta que os extratos foram obtidos por solvente hidroalcoólico, já o extrato desta pesquisa foi 100% alcoólico.

A concentração de CIMax foi avaliada para ter como base a janela de sensibilidade, onde quando a atividade antimicrobiana não se elevasse significativamente (acima de 3 mm) o teste estaria estagnado, este limiar servirá para continuidade nos testes como o de viabilidade celular com células mielomonocíticas THP-1, onde avalia-se até que ponto a concentração é viável para células humanas.

Esta atividade antimicrobiana apresentada nas cepas de *E. coli* foi demonstrada também por Silva (2010) que obteve em seus experimentos negatividade com as cepas de *E. coli* no teste de CIMM, contudo ele avaliou atividade antimicrobiana do extrato de lobeira em outros testes, como o teste antimicrobiano em tubos com caldo BHI, onde ocorreu redução na

absorvância do teste (curva cinética com extrato) comparado ao padrão (curva cinética).

Os efeitos de resistência poderão ser elucidados no teste de disco-difusão, onde poderemos avaliar o surgimento ou não de linhagens resistentes ao extrato de lobeira.

Para a determinação do enquadramento do extrato da lobeira em antibiótico, bactericida, bacteriostático ou ambos, deve-se observar o declínio em fase exponencial, segundo Parussolo (2011) o efeito bactericida máximo geralmente ocorre na fase exponencial de crescimento, fato esse que ocorre no teste de cinética microbiana para todas as cepas em teste, os picos de oscilação e atividade antimicrobiana agem da faixa exponencial para a estacionária, portanto podemos observar que os extratos de lobeira contem atividade bactericida de bacteriostática.

Alguns pesquisadores como Silva (2010) e Martins (2013) não encontraram atividade antimicrobiana de lobeira nos testes de disco-difusão em cepas de *E. coli*, no entanto utilizaram apenas o fruto da lobeira e não a parte foliar como neste trabalho. Contudo Silva (2010) observou atividade antimicrobiana em outros testes como o de curva cinética em tubo.

Martins (2013) ainda avaliou o teste de disco-difusão para cepas de *S. aureus*, onde observou ausência de atividade antimicrobiana no extrato dos frutos de lobeira, avaliou o perfil farmacognóstico da fruta de *S. lycocarpum*, encontrando atividade fungicida, contudo a ausência de atividade antibacteriana para cepa *P. aeruginosa* e enterococcus. Entretanto o extrato foliar de lobeira apresentou atividade antimicrobiana perante cepas de *P. aeruginosa*.

O teste de disco-difusão confirmou a sensibilidade das cepas utilizadas no teste ao extrato de *S. lycocarpum*, contudo até o presente momento não haviam dados concretos nem médias em relação ao tamanho da formação dos halos (mm), além disto não apresentou em nenhum teste atividade de resistência ao extrato, ou seja, sem ausência de halos irregulares nem presença de colônias isoladas internamente dos halos de inibição.

Com o teste de disco-difusão podemos comparar as médias dos halos do extrato com as médias dos halos gerados pelos fármacos de primeira escolha para as cepas de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *E. pyogenes*, assim gerar um valor comparativo da atividade antimicrobiana do extrato de lobeira com o dos fármacos de primeira escolha, conforme resultados na Tabela 2.

Em algumas concentrações o extrato foliar de lobeira ultrapassou o halo de medição do controle positivo, isto ocorreu nas cepas de *E. pyogenes* e *P. aeruginosa*, isto com seu extrato na concentração máxima, a menor sensibilidade apresentada foi com a cepa de *E. coli*, no teste ocorreram eventos de resistência perante o extrato de concentração menor (100 mg), com isto é de se esperar que a eficácia do extrato seja reduzida quando comparado ao halo formado por seu padrão positivo (Ampicilina com sulbactam 20 mg).

Portanto extrato das folhas de lobeira contém atividade antimicrobiana comprovada no teste de disco-difusão, no entanto não se sabe o mecanismo de ação do extrato.

Com os dados do teste de CIMM, estes valores aplicados a testes com maiores repetições e avaliações mais concisas da atividade antimicrobiana do extrato foliar de lobeira é necessário que tenhamos um parecer quanto a viabilidade deste extrato, se podemos utiliza-lo para fins terapêuticos contra bactérias.

Portanto o extrato foliar de *S. lycocarpum* é viável na faixa de 60 – 100 mg, nesta faixa apenas as cepas de *S. aureus* e *E. pyogenes* podem ter o extrato utilizado como fonte de tratamento, contudo pode-se utilizar o extrato como coadjuvante, junto com algum outro antibiótico para elevar a eficiência do tratamento.

## Conclusões

As cepas gram-positivas (*S. aureus* e *S. pyogenes*) são mais sensíveis ao extrato de lobeira do que as gram-negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*).

As concentrações inibitórias mínimas para as cepas de *P. aeruginosa* e *E. coli* ocorreram em concentrações mais elevadas que nas bactérias gram-positivas testadas.

Os extratos de folhas de lobeira apresentam citotoxicidade a células humanas em concentrações maiores.

Extrato das folhas de lobeira demonstra atividade inibitória no teste de disco-difusão, no entanto são requeridos mais trabalhos para testar sua viabilidade na formulação de um possível medicamento.

## Referências Bibliográficas

- AGRA, M. F.; NURIT-SILVA, K.; BERGER, L. R. Flora da Paraíba, Brasil: *Solanum* L. (Solana-ceae). **Acta Botânica Brasilica**, v. 23, 26-842, 2009.
- ALONSO-CASTRO, A. J.; MALDONADO, J. Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, n. 1, p. 292-298, 2012.
- AMAL, A.; ASHRAF, A.; HOSSAM, E. S. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of kaffaryam (*Anastatica hierochuntica*) and doumpalm (*Hyphaene thebaica*) cultivated in Egypt. **Journal Biyoloji Bilimleri Arastirma Dergisi**, v. 2, n. 2, p. 71-79, 2009.
- ASHAAL, A. Regeneration, in vitro glycoalkaloids production and evaluation of bioactivity of callus methanolic extract of *Solanum tuberosum* L. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 600-606, 2010.
- CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with biospec-ting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharma-cology**, v. 131, p. 326-342, 2010.
- CINTRA-FRANCISCHINELLI, M.; SILVA, M. G.; ANDRÉO-FILHO, N.; GENUTTI, M.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; LEITE, G. B.; CRUZ-HOFLING, M. A.; RODRIGUES-SIMONI, L.; OSHIMA-FRANCO, Y. Antithrombotic Action of *Casearia sylvestris* Sw. (Flacoutiaceae) Extracts. **Phytoterapy Research**, v. 22, n. 6, 784-790, 2008.
- FERRONATO, R.; MARCHESAN E. D.; PEZENTI, E.; BEDNARSKI, F.; ONOFRE, S. B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis Draco* *unculifolia* DC. E *Baccharis uncinella* DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 224-230, 2007.
- HERNÁNDEZ, M.; ORTIZ, A.; NECOECHEA, H. Antioxidant, Antinociceptive, and Anti Inflammatory Effects of Carotenoids Extracted from Dried Pepper (*Capsicum annuum* L.). **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 2012, n. 1-10, 2012.
- LENETTE, E. H.; BALOWS, A.; HAUSLER, W. J.; SHADOMY, H. J. **Manual de microbiologia clínica**. 4. ed. Buenos Aires: Editorial Medica Panamericana, 1987.
- MARTINS, G. Z. **Estudo Farmacognóstico e Screening Biológico de *Solanum lycocarpum* St. Hill**. 2013. 172f. Tese (Doutorado) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara, SP, 2013.
- MORAES, A. O.; MELO, E.; AGRA, M. F.; FRANÇA, F. A família Solanaceae nos "Inselber-gues" do semi-árido da Bahia, Brasil. **Série Botânica**, v. 64, 109-122, 2009.
- MORENO-SALAZAR, S. F.; ROBLES-ZEPEDA, R. E.; JOHNSON, D. E. Plant folk medicines for gastrointestinal disorders among the main tribes of Sonora, Mexico. **Fitoterapia**, v. 79, n. 2, p. 132-141, 2008.
- MOSMANN, T. Rapid calorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assay. **Journal of Immunological Methods**, Amsterdam, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, 1983.
- MURRAY, P. R.; ROSENTHAL, K. S.; PFALLER, M. A. **Microbiologia Médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6ª ed.; São Paulo: Guanabara Koogan, pag. 39-200, 2009.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests*. Approved standards M7-A5. Wayne, PA, 2008.
- PARUSSOLO, P. **Crescimento Bacteriano**. Biomedicina Farmácia, 2011. Disponível em: <http://magicnumbers-parussolo.blogspot.com.br/2011/06/crescimento-bacteriano.html> (Acessada em 23/08/2017).
- PEYRET, M.; CARRET, G.; CARRE, C.; FARDEL, G.; FLANDROIS, J. P. Mathematical study of the sensitivity curves of *Escherichia coli* exposed to polymyxins. **Pathology and Biology**, v. 38, n. 5, p. 441-445, 1990.
- SALVAGNINI, L. E.; OLIVEIRA, J. R.; SANTOS, L. E.; MOREIRA, R. R.; PIETRO, R. C. Avaliação da atividade antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 241-244, 2008.
- SCARPEL, R.; CUNHA, W. R.; LOPES, R. A.; MARTINS, C. H. G.; ALVES, E. G. Avaliação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico de *Solanum lycocarpum* (lobeira). In: **Jornada de Biomedicina**, 8, 2004, Franca. **Anais Franca**: Universidade de Franca, 2004, p. 8.
- SILVA, G. S. 2010. **Atividade Antibacteriana de plantas do cerrado da região de Botucatu-São Paulo**. (Monografia) UNESP-Botucatu, São Paulo. Disponível em <http://acervodigital.unesp.br/handle/unesp/164942> (Acessada em 12/09/2017).
- SILVA FILHO, R. R.; TORRALBO, D. F.; DIMEDEIROS, M. C. B.; BATISTA, K. de A.; FERNANDES, K. F. Immobilization of lipase in pectin extracted from lobeira fruit (*Solanum lycocarpum* St. Hill.). **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v. 1, n. 1, p. 9-14, 2012.
- SILVA, J. G.; PEREIRA, M. S.; GURMEL, A. O. D.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; SOUZA, I. A. Atividade inibitória das folhas e caule de *Kalanchoe brasiliensis* Cambess frente a microrganismos com diferentes perfis de resistência a antibióticos. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v. 19, n. 3, p. 790-794, 2009.
- TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. I. **Microbiologia**, 10ª. ed., Porto Alegre: Editora Artmed, cap. 1, p. 22-183, 2011.