

Atividade antimicrobiana de fitoconstituintes obtidos do caule de *Solanum lycocarpum* St. Hill

Antimicrobial activity of phytoconstituents obtained from the stem of *Solanum lycocarpum* Si. Hill

Actividad antimicrobiana de fitoconstituyentes obtenidos del tallo de *Solanum lycocarpum* St. Hill

Recebido: 06/12/2022 | Revisado: 29/12/2022 | Aceitado: 07/01/2023 | Publicado: 09/01/2023

Luís Fernando Albarello Gellen

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8628-1768>
Universidade Federal do Tocantins, Brasil
E-mail: lfagellen@gmail.com

Félkerson Marinho Ferreira

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2039-3035>
Universidade Federal do Tocantins, Brasil
E-mail: felkersomaiss@gmail.com

Samara Kelly Amaral Barros

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7090-8650>
Universidade Federal do Tocantins, Brasil
E-mail: aramasly@gmail.com

Sérgio Donizeti Ascêncio

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7332-9574>
Universidade Federal do Tocantins, Brasil
E-mail: sergioda@uft.edu.br

Robson Santos Barbosa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2017-9266>
Universidade Federal do Tocantins, Brasil
E-mail: robson.barbosa@uft.edu.br

Resumo

O objetivo deste projeto foi determinar a atividade antimicrobiana de extratos do caule da *Solanum lycocarpum* St. Hill. A extração ocorreu pelo método de arraste com polaridades que variam do solvente apolar ao mais polar. Após a realização de uma fitoquímica qualitativa os testes antimicrobianos realizados foram a Concentração inibitória mínima e máxima, curva cinética de crescimento bacteriano, teste de disco-difusão e concentração bactericida mínima. Cada teste se relaciona e juntos podem determinar a o potencial antimicrobiano, se os fitoconstituintes de cada extrato e polaridade são bactericidas ou bacteriostáticos e afim eventos de resistência bacteriana. Os ensaios demonstraram que a dose mínima de extrato para todas as cepas fora de acima de 20 mg e a máxima entre 160 – 180 mg. Ainda os ensaios apresentaram eventos de resistência para as cepas Gram negativas (*E. coli* e *P. aeruginosa*). Portanto os bioativos de Lobeira apresentam atividade antimicrobiana, sendo ela bactericida e bacteriostática.

Palavras-chave: Lobeira; Tocantins; Cerrado brasileiro; Bioativos; Plantas medicinais.

Abstract

The objective of this project was to determine the antimicrobial activity of extracts from the stem of *Solanum lycocarpum* St. Hill. The extraction was carried out by the drag method with polarities ranging from non-polar to more polar solvents. After performing a qualitative phytochemistry, the antimicrobial tests performed were the minimum and maximum inhibitory concentration, kinetic curve of bacterial growth, disk-diffusion test and minimum bactericidal concentration. Each test is related and together They can determine the antimicrobial potential, if the phytoconstituents of each extract and polarity are bactericidal or bacteriostatic and related to bacterial resistance events. The trials showed that the minimum dose of extract for all strains was above 20 mg and the maximum between 160 – 180 mg. The assays also showed resistance events for Gram negatives strains (*E. coli* and *P. aeruginosa*). Therefore, Lobeira bioactives have antimicrobial activity, being bactericidal and bacteriostatic.

Keywords: Lobeira; Tocantins; Brasilians cerrado; Bioactives; Medicinal plants.

Resumen

El objetivo de este proyecto él era determinar la actividad antimicrobiana de extractos del tallo de *Solanum lycocarpum* St. Hill. La extracción se llevó a cabo por el método de arraste com polaridades que van desde disolventes más polares hasta disolventes más polares. Luego de realizar una fitoquímica cualitativa, las pruebas antimicrobianas realizadas fueron concentración mínima y máxima inhibitoria, curva cinética de crecimiento bacteriano, prueba de disco-difusión mínima bactericida. Cada prueba está relacionada y em conjunto pueden determinar el potencial antimicrobiano, si los fitoconstituyentes de cada extracto y polaridade son bactericidas o bacteriostáticos y relacionados com eventos de

resistência bacteriana. Los ensayos mostraron que la dosis mínima de extracto para todas las cepas estaba por encima de los 20 mg y la máxima entre 160 – 180 mg. Los ensayos también mostraron eventos de resistencia para cepas Gram negativas (*E. coli* y *P. aeruginosa*). Por lo tanto, los bioactivos de Lobeira tienen actividad antimicrobiana, siendo bactericida y bacteriostática.

Palabras clave: Lobeira; Tocantins; Cerrado brasileño; Bioactivos; Plantas medicinales.

1. Introdução

A fitoterapia é a ciência que une o conhecimento da medicina popular, advindo de uma corrente de saberes, que na maioria das vezes são empíricos, unidos as técnicas e processos científicos para elucidar os conhecimentos transmitidos por via popular (Robson, 2012; Santos & Rosito, 2012; Silva & Oliveira, 2018)

Esta difusão de conhecimentos e utilização de plantas medicinais vem desde o início da história dos homens, esta utilização facilitou para criação de diversos medicamentos farmacêuticos. Dados de 2005 descrevem que cerca de 25% a 30% das drogas atuais no mercado farmacêutico são obtidas a partir de compostos biologicamente ativos das plantas (Calixto, 2016; Botelho, et al., 2014; Wagner, 2015; World Health Organization, 2017).

A grande importância da utilização das plantas na medicina, está relacionada com os bioativos que a planta sintetiza durante seu processo de crescimento, defesa contra patógenos ou produtos mediante a stress do ambiente como clima e escassez de água (Santana, et al., 2012; Gellen & Silva, 2016).

Ainda a mesma espécie pode apresentar diversos componentes ativos, cada um destes determinando uma função ou ação principal no organismo da planta bem como quando utilizadas como medicamento em organismos como o de humanos e animais (Jalgaonwala, et al., 2011; Santos et al., 2013).

Deste modo essa busca por novos bioativos advindos de plantas faz com que o bioma Cerrado seja considerado com um alvo de pesquisas nesta área, visto que a maioria da população que reside neste bioma faz uso de plantas medicinais (Diniz-Filho et al., 2009; Ballestra, et al., 2012). Ainda Machado e colaboradores (2008) salientam que sua fitofisionomia do cerrado é diversificada e ainda a sua ampla variedade de plantas o faz um dos 25 “hotpots” mundiais para a conservação da biodiversidade (Aquino, et al., 2007).

Pode se dizer que das espécies nativas do cerrado que já foram catalogadas e pesquisadas pela comunidade científica para fins medicinais cerca de 220 espécies tem uso medicinal descrito, seja como anti-inflamatório, antitumoral, cicatrizante e até mesmo antimicrobianos (Brasil, 2014).

Entre estas espécies nativas do bioma cerrado podemos destacar a *Solanum lycocarpum*, pertencente à família Solanaceae do gênero *Solanum*, esta espécie tem grande importância no cenário brasileiro, tanto para processos de reflorestamento de terras devastadas pelo homem, bem como para produção de alimento para espécies nativas como o *Chrysocyon brachyurus* (Motta, Guerra, et al., 2002; Pinto, et al., 2007; Agra, et al., 2009; Lu, et al., 2009; Patel, Patel, Vyas, et al., 2012; Li, et al., 2014).

É conhecida pela população do norte e nordeste do país como lobeira, fruta do lobo ou melão do cerrado. Esta espécie vegetal é considerada como uma espécie arbórea, sua altura varia de 4 a 6 metros, seu sistema radicular é do tipo profundo e composta por ramos, seu caule é revestido por pelos densos e estrelados; seus ramos são cilíndricos, lenhosos, fistulosos e tortuosos. As suas folhas são anfiestomáticas, pecioladas, com bordas irregulares que variam de 16 a 28 cm de comprimento (Felfilo et al., 1992; Caribe & Campos, 1997; Lorenzi & Matos, 2002; Elias, et al., 2003; Silva-Junior, 2005).

Pelo fato da maioria das pesquisas com esta espécie se limitarem ao seu fruto, e nem sempre dão foco aos outros constituintes como caule, raízes e folhas esta pesquisa tem como objetivo determinar a atividade antimicrobiana dos fitoconstituintes presentes na raiz e caule da *S. lycocarpum*.

2. Material e Métodos

2.1 Coleta e obtenção da amostra

Antes da realização da coleta foi necessário solicitar a autorização de coleta da espécie, no Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade (SISBio) de número 48676. Para evitar poluição e interferentes urbanos o material vegetal foi obtido no perímetro rural no município de Palmas Tocantins. Os quesitos de seleção para coleta tanto dos caules, bem como das raízes foi de estruturas integras, sem traços de contaminação ou de apodrecimento.

Em seguida as amostras foram direcionadas para o Laboratório de Pesquisas em Produtos Naturais localizado na Universidade Federal do Tocantins, uma porção do material vegetal foi armazenada, desidratada e pulverizada, sendo que outra porção foi produzida uma exsicata e encaminhada para identificação e catalogação.

2.2 Produção dos Extratos

A produção dos extratos seguiu a metodologia de Oliveira e colaboradores (2016), onde foram utilizados solventes orgânicos diretamente em ordem de polaridade crescente.

Para a primeira extração foram utilizados 120g de pó de material vegetal desidratado, sendo que cerca de 30g do pulverizado para 300 mL de solvente (1:10), estas soluções foram mantidas em banho de ultrassom por 60 minutos. Após o ultrassom o extraído foi filtrado utilizando papel de poro 0,22 μ m com sistema a vácuo e em seguida o extraído foi evaporado em rotoevaporador. O processo acima repetiu-se duas vezes com cada solvente (Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE), Metanol (MeOH) e Mix dos solventes com adição de água estilada.

2.3 Fitoquímica qualitativa

As análises fitoquímicas para alcaloides, antocianinas, antocianidinas, antraquinonas, fenóis, flavonas, flavonóides, flavonóis, leucoantocianinas, saponinas e xantonas seguiram de acordo com a metodologia de Costa (2002) citado em Costa (2002), para validação dessas análises foram utilizadas algumas espécies positivas para os compostos pesquisados.

Na análise de alcaloides, foram utilizadas as folhas da espécie *Peumus boldus* (boldo do Chile). Para antraquinonas foram utilizadas as cascas da espécie *Rhamnus purshiana* (cáscara sagrada). Para flavonoides as partes aéreas da espécie *Passiflora edulis* (maracujá). Para saponinas, as sementes da espécie *Aesculushippo castanum L.* (castanha da Índia). Para taninos foram utilizadas as cascas da espécie *Stryphnodendron barbardetiman* (barbatimão).

2.4 Atividade antimicrobiana

As análises de atividade antimicrobiana seguiram as metodologias de Peyret, et al., (1990), Miranda et al. (2015), CLSI (2013) e Mota (2011).

Para essa análise foram selecionadas as seguintes cepas ATCC *Staphylococcus aureus* ATCC 25925, *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 1706 e *Escherichia coli* 25922. Todas as cepas foram fortificadas em Ágar Brain Heart Infusion seguindo para um subseqüente cultivo em ágar Mueller Hinton em temperatura de 35 \pm 2°C sob condições aeróbicas. Com as inoculações concluídas foi adicionada solução salina NaCl a 0,9% em tubos de ensaios para o preparo das suspensões bacterianas a 0,5 da escala de McFarland (CLSI, 2013).

2.4.1 Concentração inibitória mínima (CIMin) e máxima (CIMax)

Esta metodologia é uma adaptação de da metodologia de micropoços em meio sólido Muller Hilton Para isto as cepas foram fortificadas por um período de 48 horas em meio BHI. Após isto uma alíquota de cada cepa foi ajustada na escala de 0,5 de MCFarland (CLSI, 2013).

Para a realização do teste foram semeados os microrganismos em meio Muller Hilton, em seguida foram realizadas perfurações no meio da cultura com cerca de 6mm de diâmetro, nestes orifícios foram adicionadas concentrações dos extratos em quadruplicata, as concentrações variaram de 10 a 200 mg, com diferença de 10 mg das doses, posteriormente foram incubadas por 24 horas a 37 °C.

A leitura dos resultados seguiu a metodologia de Silva et al. (2020) e Gellen e colaboradores (2019), sendo que 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.

2.4.2 Concentração inibitória mínima em micropoços

Este teste se baseia em análise colorimétrica utilizando método de microdiluição em poços de Elisa de fundo chato. São adicionados 100µL Ágar Mueller Hinton em todos os poços, logo após se adicionou 60µL do extrato da *S. lycocarpum* com concentrações entre 1mg/mL; 2mg/mL; 3mg/mL; 4mg/mL; 5mg/mL; 6mg/mL; 7mg/mL; 8mg/mL; 9mg/mL; 10mg/mL; no final das diluições foi realizada a inoculação com 10 µL de suspensão bacteriana. O teste foi realizado em quadruplicata.

Foram reservados dois poços para os controles positivos e dois poços para controles negativos. O primeiro controle positivo continha apenas o ágar em caldo com as cepas bacterianas, o segundo controle apresentava o ágar em caldo com cepas bacterianas e DMSO a 10%. Os dois controles negativos foram da esterilidade do meio e do extrato (Miranda et al.,2015; CLSI ,2013).

A placa foi incubada em condições aeróbicas a 35± 2°C por 24 horas. Considerando que o crescimento ou inibição apresentasse uma concentração muito pequena foi adicionado 30µL de corante Rezasurina 0, 003 % em cada poço da placa para auxiliar na visualização do crescimento microbiano. A placa foi incubada novamente por 4 horas a 35± 2°C. A Resazurina baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea).

Este teste tem utilização para determinar se valores menores apresentam atividade antimicrobiana, diferente do teste de CIMin e CIMax, entretanto serão realizados testes com os valores da CIMin e CIMax que apresentarem atividade antimicrobiana.

2.4.3 Curva de cinética bacteriana

Este teste é uma adaptação da curva cinética bacteriana e se baseia na metodologia de Peyret, et al., (1990). As curvas cinéticas das bactérias testadas foram em função dos pontos e tempo de estabilidade nas fases lag, exponencial, estacionária e declínio. Após estabelecidos os tempos e fases normais a curva cinética das bactérias, utilizando as concentrações máxima e mínima do teste de CIMM, outra curva cinética será traçada a curva cinética bactéria, estabelecidos os tempos em que cada bactéria permanece em suas fases outra curva será traçada, adicionando ao teste as concentrações do extrato de lobeira obtidas no teste de CIMin e CIMax.

Nesta metodologia foi necessário anular a absorvância emitida pelo extrato de lobeira, para isto foi utilizado um padrão para cada concentração testada, assim permitindo observar apenas a multiplicação bacteriana.

2.4.4 Disco de difusão em ágar

O teste disco de difusão foi realizado conforme metodologia do CLSI (2013). Foram utilizadas as suspensões bacterianas a 0,5 da escala McFarland em placas com Agar Mueller Hinton, as placas foram semeadas pelo método de tapete homogêneo.

De acordo com Miranda et al. (2015), após a inoculação do meio foram adicionados discos com alíquotas de 10 µL dos extratos com as concentrações com atividade antimicrobiana evidenciadas nos testes acima, esse procedimento foi realizado quadruplicara, onde o controle positivo foram discos comerciais de antibióticos de acordo com cada bactéria, sendo Penicilina

de 10 mg e Vancomicina 30mg para as Gram positivas e Meropeném de 10 mg para as Gram negativas, e controle negativo foi apenas discos com água destilada .

As placas foram incubadas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, em condições aeróbicas por 24 horas, ao final desse período foi realizada a leitura do diâmetro dos halos com o auxílio de um paquímetro.

3. Resultados e Discussão

3.1 Fitoquímica Qualitativa

As análises fitoquímicas qualitativas estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 - Triagem fitoquímica qualitativa da amostra de *S. lycocarpum*.

<i>Triagem fitoquímica</i>	<i>Amostra</i>	<i>Controle Positivo</i>
<i>Alcaloides</i>	-	+
<i>Antraquinonas</i>		
<i>Livres</i>	-	+
<i>Heterosídicas</i>	-	+
<i>Flavanoídes</i>		
<i>Reação de Shinoda</i>	+ (Vermelho)	+ (Laranja)
<i>Reação com Cloreto de Alumínio</i>	+	+
<i>Saponinas</i>		
<i>Teste de espuma</i>	+	+
<i>Reação de Salkoski</i>	+	+
<i>Taninos</i>	+	+
<i>Reação de gelatina</i>	+	+
<i>Reação de sais de ferro</i>	+ (Verde)	+ (Azul)
<i>Reação com acetato de chumbo</i>	+	+

Nesta tabela estão os valores da triagem fitoquímica das amostras de caule de *S. lycocarpum*. Fonte: Autores (2022).

A produção de bioativos está ligada a fatores ambientais, fitopatológicos e simbiose fúngica nas plantas, ainda a produção de flavonoides, taninos e saponinas identificadas na triagem e dispostas na Tabela 1 determinam uma atividade antimicrobiana (Menezes Filho & Souza Castro, 2019).

Bem como Melo (2018), Gellen e colaboradores 2019 explanam que os bioativos de *S. lycocarpum* apresentam atividade antimicrobiana por consequência da grande quantidade de flavonoides e taninos, demonstrando uma característica antimicrobiana e antifúngica contra fungos de interesse médico.

3.2 CIMin e CIMax

Este teste é de suma importância para determinar a dose mínima de atividade antimicrobiana e a dose máxima, ainda pode-se determinar a partir de que concentração deve-se iniciar ensaios como o teste de disco-difusão em discos, poços e micro poços (Gellen et al., 2019).

Todos os extratos apresentaram atividade antimicrobiana, entretanto diferem em concentração (mg) para cada MMO (microrganismo). Para demonstrar estas variações na concentração inibitória mínima e máxima os dados e bactérias estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2 - Média dos valores da CIMin e CIMax (mg/mL).

Extratos	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
<i>HX</i>	20 - 140	20 - 160	20 - 120	20 - 100	20 - 100
<i>DCM</i>	20 - 120	20 - 120	20 - 80	20 - 80	20 - 100
<i>AcOEt</i>	20 - 160	80 - 180	20 - 100	20 - 60	40 - 160
<i>ACE</i>	20 - 80	60 - 100	40 - 140	60 - 120	20 - 100
<i>MeOH</i>	20 - 100	80 - 140	20 - 100	20 - 100	40 - 100
<i>Mix</i>	20 - 80	20 - 60	20 - 80	20 - 100	40 - 100

Valores da CIMin e CIMax (mg) dos extratos testados de acordo com o tipo de arraste, sendo Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE), Metanol (MeOH) e Mix dos solventes com adição de água estilada. Fonte: Autores (2022).

Percebe-se que mesmo produzindo o extrato com todos os arrastes não há uma sensibilidade a concentrações menores que apresentada pelos extratos isolados, portanto pode-se determinar uma possível atividade antagônica de bioativos ou interferência de suas atividades, ou até mesmo um arraste pode desnaturar o bioativo.

Nota-se que o extrato AcOEt apresentou uma maior concentração de atividade no ensaio (20- 160 mg) para a espécie *S. aureus*, seguido do extrato Hx (20-160 mg) para *S. pyogenes*, ainda Hx (20-120 mg) e ACE (40 – 140 mg) para *P. aeruginosa* seguidos da cepa de *E. coli* com o extrato AcOEt (40-160 mg).

Em foco dos métodos de arraste e comparando com a fitoquímica expressa acima pode se determinar que os métodos de arraste mais apolares tem maior capacidade de arrastar bioativos como flavonoides e saponinas, já os taninos são extraídos por substâncias mais polares, como por exemplo a água. Ainda podem existir arrastes que conseguem retirar quantidades de bioativos polares e apolares. (Silva, 2020; Almeida & Gomes, 2020; Araujo et al., 2020).

Quando testadas outras porções anatômicas da espécie vegetal por outros pesquisadores os valores de CIMin partiu de 10 mg, como ocorrera com a parte foliar (Melo et al., 2018; Gellen et al., 2019), ainda a CIMax nos mesmos artigos foram de 160 – 180 mg.

Ainda em comparativo com os outros ensaios dos pesquisadores citados acima e estes ensaios realizados deve se estar atentos que os métodos de extração foram por arraste e nos artigos mencionados acima o método de extração foi apenas aquoso e etanólico, a redução nas concentrações mínimas e máximas podem estar reduzidas pela seletividade das substâncias ocorrer de maneira seriada de acordo com suas polaridades e não ocorrendo de maneira conjunta.

Ainda foram estabelecidas as medições dos halos de sensibilidade de cada CIMin e CIMax, estas estão representadas com as medias na Tabela 3.

Tabela 3 - Média dos valores da CIMin e CIMax (mg/mL).

Extratos	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
	CIMin X CIMax	CIMin X CIMax	CIMin X CIMax	CIMin X CIMax	CIMin X CIMax
HX	7,5 - 13,2	5,7 - 15,1	3,4 - 10,5	7 - 14,4	4,8 - 10,7
DCM	4,9 - 11	4,2 - 14,8	3 - 9,8	4,5 - 11,4	5,5 - 12
AcOEt	4,2 - 13,3	5 - 13,7	3,4 - 9,2	3,5 - 10,8	4,2 - 11,7
ACE	3,3 - 10,8	4,6 - 11,1	4,5 - 10,9	3 - 10,8	3,9 - 9,9
MeOH	2,9 - 11,6	3,7 - 7,5	2,9 - 9	3,6 - 10,6	4,2 - 11,7
Mix	3,7 - 12,5	4,8 - 8,7	3,3 - 9	3,2 - 10,3	4,4 - 12,8

Médias dos halos da CIMin e CIMax (mg/mL). Sendo os extratos nomeados de acordo com o tipo de arraste, sendo Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE), Metanol (MeOH) e Mix dos solventes com adição de água estilada. Fonte: Autores (2022).

Observando as Tabelas 2 e 3 pode-se determinar que a concentração utilizada foi proporcional ao crescimento do halo, entretanto faz-se necessário estabelecer a CIMax para determinar até que concentração há atividade antimicrobiana real, visto que todos os valores máximos foram determinados quando a estagnação do crescimento do halo em mm não ocorria (conforme elevava a concentração e halo de inibição não se elevava acima de 3mm).

Esta análise é de suma importância, visto que pode-se determinar ainda a diferença da dose curativa e a citotoxicidade pode ser evitada isto pelo fato de não necessitar elevar doses sabendo que não haverá atividade antimicrobiana efetiva.

Ainda avaliando os resultados obtidos no ensaio de CIMin x CIMax, quando comparadas as Tabelas 2 e 3 com os controles positivos (Penicilina 10 mg, Vacomicina 30 mg e Meropeném 10 mg) os valores dos extratos são menores que 50% em comparação com os controles. Deve-se considerar que os extratos mesmo sendo arrastados por polaridade ainda não estão elaborados nem purificados como as drogas comercializadas, mesmo assim representam atividade antimicrobiana.

3.3 Concentração inibitória mínima em micropoços

Este ensaio além de utilizadas as concentrações do teste CIMin x CIMax foram testadas as concentrações de 1 – 20 mg, visto que se trata de um teste colorimétrico com auxílio da espectrofotometria.

Os testes com concentrações menores (1 - 20mg/mL) apresentaram redução da rezausurina momentâneo (30 - 60 min), os micropoços logo voltaram a cor de negatificação do teste.

Coelho (2021) descreve a mesma reação citada acima com ensaios em cepas de *Nocardia* spp, isto sugere que seja executado o teste de disco-difusão em agar sólido, visto que a pesquisadora executou o teste e os valores foram negativados e apresentaram resistência.

Já com os valores obtidos no teste de CIMin x CIMax estabelecidos apresentaram mudança de cor e se estabeleceram fixas, visto que este procedimento confirmou a atividade antimicrobiana das concentrações testadas e positivadas com sensibilidade no teste de CIMin x CIMax.

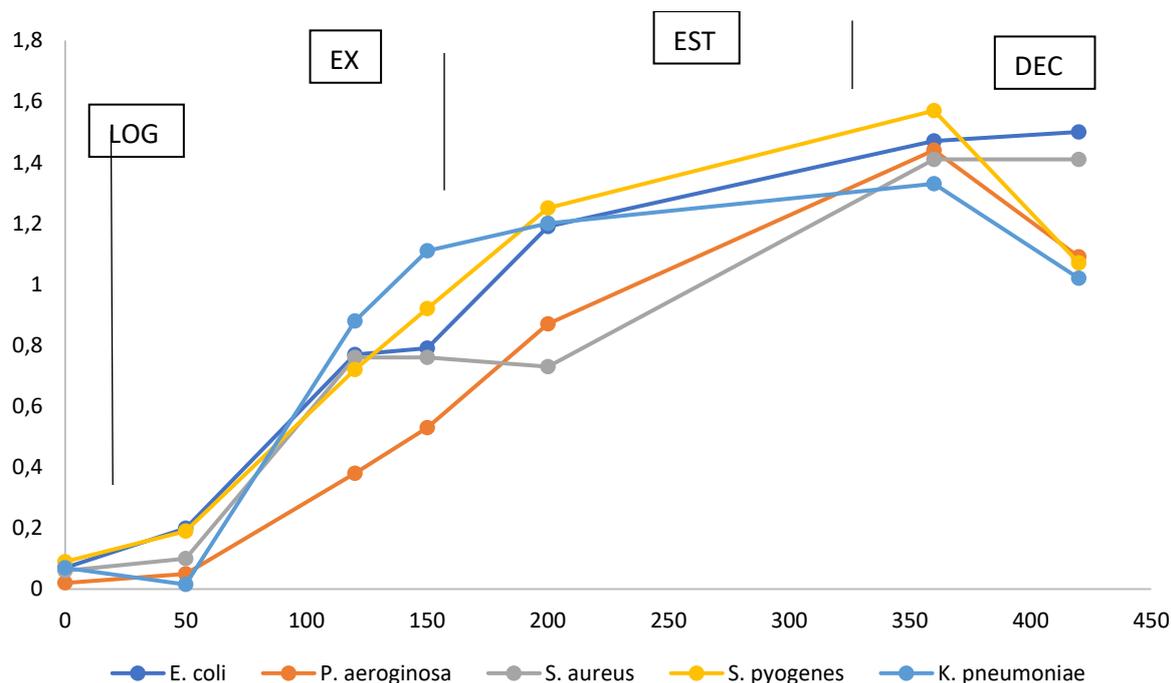
Entretanto alguns valores da CIMin deferiram, como os da *E. coli* (MeOH) que fora positivo com 60 mg/mL e *S. aureus* (ACE) com 40 mg/mL). Já sobre a CIMax alguns valores foram regredidos no teste de micropoços, sendo os de *K. pneumoniae* (ACE) 100 mg/mL; *E. coli* (AcOEt) 140 mg/mL e *S. pyogenes* (DCM) 140 mg/mL.

Os dois testes serviram para validação dos resultados um do outro e ainda determinar os limites de concentrações mínimas dos extratos de Lobeira com atividade antimicrobiana, e estes valores variam de acordo com o tipo de arraste (polaridade dos bioativos).

3.4 Curva de cinética bacteriana

Neste teste foi traçada uma curva cinética de crescimento bacteriano para cada bactéria, estas curvas determinaram todas as fases de crescimento bacteriano, sendo que todas as bactérias atingiam sua fase de crescimento aos 360 min. Estes dados estão dispostos no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Curva cinética de crescimento exponencial bacteriano.



Curvas de crescimento exponencial bacteriano: Tempo (min) X Absorbância. Delimitação da fase LOG, EX (exponencial), EST (estacionária) e a DEC (declínio). Fonte: Autores (2022).

Observando o Gráfico 1, pode-se determinar que todas as bactérias alcançaram a fase lag até no máximo em 50 min de teste, a fase exponencial dos 51 – 250 min, estacionária 250 – 350 e a fase de declínio após os 350 minutos.

Após determinar as fases de crescimento de cada bactéria foram traçadas novas curvas de crescimento bacteriano utilizando as concentrações com atividade antimicrobiana no teste de CIMin e CIMax. As concentrações utilizadas estão listadas na Tabela 4.

Tabela 4 - Concentrações aplicadas ao teste de curva de crescimento exponencial bacteriano.

Extratos	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
HX	20,60,80,140	20,60,100,140	20, 40,80, 120	20,40,60,100	20,40,60,100
DCM	20, 40,80, 120	20, 40,80, 120	20,40,60,80	20,40,60,80	20,40,60,100
AcOEt	20, 40,80, 120, 140	80, 120, 140,180	20,40,60,100	20,40,60	40, 80, 120,160
ACE	20,40,60,80	60,80,100,120	40, 80, 120,140	60,80,100,120	20,40,60,100
MeOH	20,40,60,100	80,100,120,140	20,40,60,100	20,40,60,100	40,60,100,120
Mix	20,40,60,80	20,40,60,80	20,40,60,80	20,40,60,100	40,60,80,100

Concentrações aplicadas ao teste de curva de crescimento exponencial bacteriano. Valores da CIMin e CIMax (mg) dos extratos testados de acordo com o tipo de arraste, sendo Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE), Metanol (MeOH) e Mix dos solventes com adição de água estilada. Fonte: Autores (2022).

Para enquadrar um extrato como antimicrobiano, bactericida, bacteriostático ou ambos, deve-se traçar a curva cinética bacteriana com a adição dos extratos (Gellen et al., 2019). Deste modo um bacteriostático atua fase de crescimento exponencial da curva, já o bactericida na fase log e exponencial (Martinez Freijo, 2019; Rocha, 2020).

Todos os extratos independentemente da concentração ou arraste causaram um adiantamento no tempo das etapas da cinética de crescimento bacteriano, portanto foram traçadas médias de cada etapa e estão dispostas na Tabela 5.

Tabela 5 - Média de regressão da curva cinética bacteriana após a adição das concentrações de extratos.

Extratos	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
	Lag/Exp/Est/Dec				
HX	158/135/250	144/129/241	90/188/300	108/197/272	129/177/265
DCM	147/144/267	151/130/255	99/200/307	99/200/268	120/180/267
AcOEt	141/137/282	168/135/241	81/172/287	81/213/255	133/182/242
ACE	162/147/277	169/155/256	97/200/297	80/209/288	147/191/300
MeOH	152/144/280	155/157/250	88/188/300	79/200/279	139/190/277
Mix	113/181/328	100/197/300	67/200/314	72/217/328	93/241/325

Média da Curva cinética bacteriana após adição dos extratos. Sendo cada extrato identificado com seu tipo de arraste, onde Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE), Metanol (MeOH) e Mix dos solventes com adição de água estilada. Fonte: Autores (2022).

Todas as cepas bacterianas elevaram sua fase lag, ou seja, independentemente do extrato de Lobeira ou do tipo de solvente para o arraste existem bioativos com atividade antimicrobiana no caule desta espécie vegetal.

Entretanto observando os dados da curva cinética pode-se observar que os bioativos têm uma atividade antimicrobiana com maior eficácia em bactérias gram positivas como visto nas cepas de *S. aureus*, *S. pyogenes* e uma atividade antimicrobiana moderada perante bactérias gram negativas.

Estas observações podem ser evidentes quando comparados os tempos alargados das fases lag, redução das fases exponenciais, estacionária e declínio quando utilizados os extratos independentemente das concentrações. Ainda pode-se observar eventos de resistência nas cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa* onde os valores oscilaram na fase exponencial.

Outra observação determinada pela curva exponencial de crescimento bacteriano é a atividade bactericida e bacteriostática que podem ser observadas quando comparados os tempos das fases lag e exponencial. Este dado é importante para determinar qual a classificação da atividade antimicrobiana de cada fármaco ou extrato (Sousa, Viana, Figueirêdo & Viana, 2022; Trindade et al., 2021).

3.5 Teste de disco-difusão

Para determinar a atividade antimicrobiana e possíveis fenômenos de resistência o teste de disco-difusão foi fundamental, ele ainda determina os eventos irregulares apresentados na curva de crescimento exponencial bacteriano. As médias de cada halo estão dispostas logo abaixo na Tabela 6.

Tabela 6 - Média dos halos (mm) dos testes de disco-difusão de acordo com as concentrações (mg/mL).

Extratos	<i>S. aureus</i>	<i>S. pyogenes</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>
HX	7,5/8,8/8,8/10	10/10,7/10,9/11,4	3,4/4,2/6,5/10	4,2/5,7/5/6,2	3,3/3,9/4,5/6,2
DCM	4,1/5,7/5,7/6	3,3/3,5/4,4/5,9	3,4/3,6/3,8/3,8	4,1/4,7/4,5/4,4	3,1/3,7/3,7/4,5
AcOEt	5,2/5,8/6,1/6,1/6,4	7/7,2/7,7/8,5/8,9	3,7/3,8/4/4,2	3/3,6/3,6	3,5/3,5/3,7/3,6
ACE	4,4/4,5/5,1/5,2	5,8/6,3/6,7/6,6	3/3,4/3,8/3,7	2,9/3,7/3,8/3,4	3,7/4/4,2/4,2
MeOH	5,1/5,1/5,7/6	7,8/7,8/8/10	3,7/3,7/3,8/3,8	2,8/2,9/4/4,7	3,2/3,5/3,8/4,1
Mix	4,1/4/4,2/3,9	3,8/3,9/4,7/4,7	2,8/3/3,1/3,4	3,3/3,1/3,8/4	2,9/3,2/3,3/3,5

Nesta tabela estão dispostas as médias dos halos dos testes de disco-difusão, estão organizados de acordo com as concentrações testadas na curva cinética de crescimento bacteriano. Cada extrato identificado com seu tipo de arraste, onde Hexano (Hx), Diclorometano (DCM), Acetato de etila (AcOEt), Acetona (ACE), Metanol (MeOH) e Mix dos solventes com adição de água estilada. Fonte: Autores (2022).

Para as cepas de *S. aureus*, *S. pyogene* e *K. pneumoniae* nenhum dos extratos e suas concentrações apresentaram atividade de resistência bacterina, todos os halos foram formados sem aparecimento de colônias isoladas ou halos irregulares.

Já as cepas de *E. coli* e *P. aeruginosa* ocorreram atividades de resistência, onde halos irregulares e cepas isoladas foram encontradas dentro dos halos de sensibilidade. Este evento foi demonstrado nas oscilações na curva cinética de crescimento bacteriano.

Entretanto os halos foram menores no extrato Mix, isto comprova como nos testes acima que o método de extração utilizando vários arrastes e polaridades pode deteriorar ou anular os bioativos com atividade antimicrobiana. Mesmo contendo todos os fitoconstituintes do caule.

4. Conclusão

Considerando os achados o caule de *Solanum lycocarpum* apresenta atividade antimicrobiana, e os bioativos presentes (flavonoides, taninos e saponinas) desempenham o papel fundamental para esta atividade.

Quanto ao método de extração pode-se determinar que houve atividade em todos os métodos, desde os apolares para os mais polares, entretanto a atividade se apresentou homogênea entre as cepas.

Ainda os bioativos presentes no caule desta espécie apresentam uma atividade antibacteriana tanto bactericida quanto bacteriostática, visto que houve uma maior atividade antimicrobiana perante as cepas Gram positivas.

E futuramente deve-se ainda determinar a citotoxicidade dos extratos perante células humanas, pois mesmo que apresentando atividade antimicrobiana em comparação com os antimicrobianos industrializados necessitam-se de mais testes para o custo-benefício do uso destes extratos e uma possível droga antibacteriana.

E ainda realizar uma cromatografia de alta performance para saber as concentrações exatas e quais os bioativos que apresentam esta atividade bactericida e bacteriostática, para uma possível filtração e isolamento das mesmas. Por consequência poder ver suas viabilidades para utilização no mercado de antimicrobianos.

Referências

- Agra, M. F., Nurit-Silva, K., & Berger, L. R. (2009). Flora da paraíba, Brasil: Solanum L. (Solanaceae). *Acta Botanica Brasilica*, 23, 826.
- Almeida, D. J., & Gomes, C. C. (2020). Atividade antimicrobiana do extrato de acetato de etila de Coix lacryma-jobi sobre. *Luminária*.
- Aquino, F. D. G., & Oliveira, M. C. (2006). Reserva legal no bioma cerrado: uso e preservação.
- Araujo Santiago, M. C. P., Anjos, M. R., Jesus, M. S. C., Souza, M. D. L. M., Pacheco, S., & Bizzo, H. R. (2020). Análise e caracterização de taninos condensados por cromatografia líquida. *Brazilian Journal of Development*, 6(8), 61446-61462.
- Ballestra, C. L., Silva, F. G., Soares, M. P., Reys, P., & Vasconcelos Filho, S. C. (2012). Anatomia foliar de Byrsonima basiloba. A. JUSS. *I Congresso de Pesquisa e Pós-Graduação do Câmpus*. Rio Verde - Goiás.
- Botelho, N., Brito, N. B., & Silva, N. M. (2014). A utilização de plantas medicinais pela comunidade do Canal da Visconde. *Revista Paraense de Medicina*, 28(1), 63.
- Brasil-Ministério do Meio Ambiente. (2014). Portaria MMA nº 443 de 17 de dezembro de 2014. *Diário Oficial da União de 18 de dezembro de 2014*, 110-121.
- Calixto-Júnior, J. T., Morais, S. M., Colares, A. V., & Coutinho, H. D. M. (2016). The genus Luehea (Malvaceae-Tiliaceae): review about chemical and pharmacological aspects. *Journal of pharmaceutics*, 2016, 1-9.
- Caribe, J., & Campos, J. M. (1997). *Plantas que ajudam o homem*. (5 ed.): Cultrix/ Pensamento.
- CLSI publication M100-S23 Suggested Grouping of US-FDA Approved Antimicrobial Agents That Should Be Considered for Routine Testing and Reporting on Nonfastidious Organisms by *Clinical Laboratories*, 2013.
- Coelho, V. C. (2021). *Avaliação da suscetibilidade antimicrobiana de isolados de Nocardia spp. por microdiluição em caldo com o uso de resazurina e espectrofotometria* (Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo).
- Costa, A. F. (2002) *Farmacognosia*. 6. Ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Diniz-Filho, J. A. F., Oliveira, G. D., Lobo, F., Ferreira, L. G., Bini, L. M., & Rangel, T. F. L. V. B. (2009). Agriculture, habitat loss and spatial patterns of human occupation in a biodiversity hotspot. *Scientia Agricola*, 66, 764-771.
- Elias, S. R., Assis, R. M., Stacciarini-Seraphin, E., & Rezende, M. H. (2003). Anatomia foliar em plantas jovens de Solanum lycocarpum A. St.-Hil.(Solanaceae). *Brazilian Journal of Botany*, 26, 169-174.
- Felfili, J. M., Silva Jr, M. C. D., Rezende, A. V., Machado, J. W. B., Walter, B. M. T., Silva, P. E. N. D., & Hay, J. D. (1992). Análise comparativa da florística e fitossociologia da vegetação arbórea do cerrado sensu stricto na Chapada Pratinha, DF-Brasil. *Acta botanica brasilica*, 6, 27-46.
- Gellen, L. F. A., & Silva, E. H. C. (2016). Atividade antimicrobiana de extratos de raízes de Byrsonima crassifolia. *J. Bioen. Food Sci*, 3(1), 63-71.
- Gellen, L. F. A., Tavares, A. T., Momenté, V. G., Ferreira, T. A., Coelho, R. S., & Nascimento, I. R. (2019). Viabilidade de extratos etanolicos de folhas de lobeira (Solanum lycocarpum A. ST.-HIL.) no controle de bactérias de interesse médico. *Biota Amazônia*, 9(3), 24-29.
- Jalgaonwala, R. E., Mohite, B. V., & Mahajan, R. T. (2011). A review: natural products from plant associated endophytic fungi. *J Microbiol Biotechnol Res*, 1(2), 21-32.
- Kanugula, K. A., Kotamraju, S., Karunakaran, C., & Rajendran, A. (2014). Cytotoxic and antibacterial activities of secondary metabolites from endophytic fungus Pestalotiopsis virgatula VN2. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 4(1), 107-115.
- Li, J., Zhang, L., Huang, C., Guo, F., & Li, Y. (2014). Five new cytotoxic steroidal glycosides from the fruits of Solanum torvum. *Fitoterapia*, 93, 209.
- Lima, F. J. C. Secagem da polpa de murici (*Byrsonima crassifolia*) e efeitos sobre compostos bioativos. (2017). 30 f. *Tese (Doutorado) - Curso de Engenharia e Ciência de Alimentos*, Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", São Jose do Rio Preto.

- Lorenzi, H., & Abreu Matos, F. J. (2002). *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Instituto Plantarum, 102-134.
- Lu, Y., Luo, J., Huang, X., & Kong, L. (2009). Four new steroidal glycosides from *Solanum torvum* and their cytotoxic activities. *Steroids*, 74(1), 95-101.
- Machado, R. B., Aguiar, L. M., Castro, A. A. J. F., Nogueira, C. C., & Ramos-Neto, M. B. (2008). Caracterização da fauna e flora do Cerrado. *Savanas: desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais*. Brasília, *Embrapa*, 284-300.
- Martínez Freijo, P. (2019). Estudio de la actividad antibacteriana y efecto sobre la fagocitosis inducidos por amoxicilina, amoxicilina-clavulanico y cefotaxima frente a " *Streptococcus pneumoniae*". *Ene*, 11, 17.
- Melo, M. P. (2018). Viabilidade de Extratos Etanolicos de Folhas de Lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hill) no Controle de Fungos de Interesse Médico. *Revista Cereus*, 10(1), 78-90.
- Menezes Filho, A. C. P., & Souza Castro, C. F. (2019). Identificação das classes de metabólitos secundários em extratos etanólicos foliares de *Campomanesia adamantium*, *Dimorphandra mollis*, *Hymenaea stigonocarpa*, *Kielmeyera lathrophytum* e *Solanum lycocarpum*. *Estação Científica (UNIFAP)*, 9(1), 89-101.
- Miranda, J. A. L., Rocha, J. A., Araujo, K. M., Quelemes, P. V., Mayo, S. J., & Andrade, I. M. (2015). Atividade antibacteriana de extratos de folhas de *Montrichardia linifera* (Arruda) Schott (Araceae). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 17, 1142-1149.
- Mota, M. R. S. (2011). Análise da atividade antimicrobiana de extratos e frações purificadas da planta *arrabidaea chica* verl. *Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do Amazonas*, Manaus.
- Motta, S., Guerra, M. D. O., Peters, V. M., & Reis, J. E. D. P. (2002). Administração de polvilho de lobeira (*Solanum lycocarpum* St. Hil.) a ratas lactando: desenvolvimento físico das crias. *Lecta-USF*, 53-60.
- Oliveira, S. C. C., Gualtieri, S. C. J., Macías Domínguez, F. A., González Molinillo, J. M., & Varela Montoya, R. (2012). Estudo fitoquímico de folhas de *Solanum lycocarpum* A. St.-Hil (Solanaceae) e sua aplicação na alelopatia. *Acta botânica brasílica*, 26, 607-618.
- Oliveira, V. B., Zuchetto, M., Oliveira, C. F., Paula, C. S., Duarte, A. F. S., Miguel, M. D., & Miguel, O. G. (2016). Efeito de diferentes técnicas extrativas no rendimento, atividade antioxidante, doseamentos totais e no perfil por clae-dad de *dicksonia sellowiana* (presl.). *Hook, dicksoniaceae*. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 18, 230-239.
- Patel, P. K., Patel, M. A., Vyas, B. A., Shah, D. R., & Gandhi, T. R. (2012). Antirolithiatic activity of saponin rich fraction from the fruits of *Solanum xanthocarpum* Schrad. & Wendl. (Solanaceae) against ethylene glycol induced urolithiasis in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 144, 160-170.
- Peyret, M., Carret, G., Carre, C., Fardel, G., & Flandrois, J. P. (1990). Mathematical study of the sensitivity curves of *Escherichia coli* exposed to polymyxins. *Pathologie-biologie*, 38(5), 441-445.
- Pinto, L. V., Silva, E. A., Davide, A. C., Jesus, V. A. M., Toorop, P. E., & Hilhorst, H. W. (2007). Mechanism and control of *Solanum lycocarpum* seed germination. *Annals of Botany*, 100(6), 1175-1187.
- Robson, N. K. (2012). Studies in the genus *Hypericum* L. (Hypericaceae) 9. Addenda, corrigenda, keys, lists and general discussion. *Phytotaxa*, 72, 1-111.
- Rocha, R. R. (2020). Estudo comparativo sobre a composição química, atividade antibacteriana e efeito sinérgico dos óleos essenciais de *Croton tetradenius* Baill. e *c. pulegioidorus* Baill. Contra isolados de *Staphylococcus aureus*. *Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - Campus de Sobral, Universidade Federal do Ceará*, Sobral.
- Santana, M. L. C., Paula, E. R., & Rosa, F. M. (2012) Estudo cienciométrico e etnobotânico sobre uma planta medicinal do cerrado: *mama-cadela* (*Brosimum gaudichaudii* Trécul). *Revista de Biologia e Farmácia*, 7(2), 119-132.
- Santos, B. M. M., & Rosito, J. M. (2012). Uso de plantas medicinais como instrumento e conscientização: responsabilidade social e ambiental. *Monografias Ambientais*, 7(7), 1478-1491.
- Santos, L. S., Rhoden, S. A., Barros, I. T., Tonini, R. C. G., Marques, R. M., Souza, V. H. E., & Pamphile, J. A. (2013). A interação harmônica entre fungos e plantas: aspectos da relação endófito/hospedeiro. *SaBios-Revista de Saúde e Biologia*, 8(1), 92-101.
- Silva-Junior, M. C. (2005). *100 árvores do Cerrado: guia de campo*. Brasília, Rede de sementes do Cerrado.
- Silva, M. I., & Oliveira, H. B. (2018). Desenvolvimento de software com orientações sobre o uso de plantas medicinais mais utilizadas do sul de Minas Gerais. *Brazilian Applied Science Review*, 2(3), 1104-1110.
- Silva, S. L. C. (2020). Atividade fotoprotetora e composição química DE *Lippia thymoides*. *Anais dos Seminários de Iniciação Científica*, (24).
- Sousa, A., Viana, D. D. S. F., Figueirêdo, G. S., & Viana, V. G. F. (2022). Géis, extratos naturais e nanopartículas de Ag para ação bactericida Gels, natural extracts and Ag nanoparticles for bactericidal action. *Brazilian Journal of Development*, 8(1), 7989-8001.
- Trindade, S. C., Pereira-Filho, J. N., Neto, L. O. B., de Oliveira Moura, T. B., Farias, A. P. F., Rocha Filho, J. T. R., & Lucchese, A. M. (2021). Atividade antimicrobiana dos extratos metanólicos de diferentes espécies do gênero *Lippia*. *Research, Society and Development*, 10(9), e22610918051-e22610918051.
- Wagner, G. A. (2015). Tratamento de depressão no idoso além do cloridrato de fluoxetina. *Revista de Saúde Pública*, 49, 20.
- World Health Organization. (2017). *The world health report: 2001: mental health: new understanding, new hope*. Genebra.