

AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATO HEXÂNICO DAS FOLHAS DE *Solanum cernuum* VELL (SOLANACEAE)

Bárbara Altoé Milaneze¹, Roney Martinho Barcelos², Fábio Ribeiro Pires³, Valdenir José Belinelo³, Eder Barbosa de Aguiar⁴

1. Bolsista de Iniciação Científica do CEUNES, Universidade Federal do Espírito Santo. Brasil (b_milaneze@hotmail.com)

2. Doutor, Professor do Programa de Pós-Graduação em Agricultura Tropical, CEUNES, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, ES.

3. Mestre, CEUNES, Universidade Federal do Espírito Santo, São Mateus, ES.

Data de recebimento: 07/10/2011 - Data de aprovação: 14/11/2011

RESUMO

Os desafios no tratamento de doenças infecciosas vêm crescendo de forma significativa. Geneticamente, as bactérias adquirem e transmitem resistência a antibióticos, assim como também a agroquímicos. Considerando que, a maioria das perdas econômicas em culturas acontece com o ataque de fungos, bactérias e vírus; métodos que visam mitigar tais perdas na produção e produtividade são de extrema importância. O estudo tem como objetivo a avaliação do potencial antimicrobiano do extrato hexânico das folhas de *Solanum cernuum* Vell frente às cepas de bactérias e fungos, pela técnica de microdiluição em microplacas de 96 poços. Verificou-se atividade inibitória do crescimento de todos os 4 fungos testados, *Colletotrichum musae*, *Fusarium solani* f. sp. Phaseoli, *Fusarium solani* f. sp. piperis Alb. e *Penicillium* sp., com CIM igual a 125,0 µg/mL, 62,5 µg/mL, 250,0 µg/mL e 250,0 µg/mL, respectivamente. Para as bactérias, o extrato não apresentou atividade inibitória significativa, até concentração igual a 1000,0 µg/mL.

PALAVRAS-CHAVE: *Solanum cernuum*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium*, *Penicillium*

EVALUATION OF *in vitro* ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF HEXANE EXTRACT FROM LEAVES OF *Solanum cernuum* Vell (SOLANACEAE)

ABSTRACT

The challenges in the treatment of infectious diseases have been growing significantly. Genetically, the bacteria acquire and transmit antibiotics resistance, as well as agrochemicals. Whereas the majority of economic losses in crops occurs by the attack of fungi, bacteria and viruses; methods intended to mitigate such losses in production and productivity are paramount. The study aims to evaluate the antimicrobial potential of extract of leaves of *Solanum cernuum* Vell facing of strains of bacteria and fungi, by the microdilution technique in 96-well microplates. There was growth inhibitory activity of all four fungi tested, *Colletotrichum musae*, *Fusarium solani* f. sp. Phaseoli, *Fusarium solani* f. sp. piperis Alb. and *Penicillium* sp., with MIC equal to 125.0 µg/mL, 62.5 µg/mL, 250.0 µg/mL and 250.0 µg/mL, respectively. For

bacteria, the extract did not show significant inhibitory, up to a concentration equal to 1000.0 µg/mL.

KEYWORDS: *Solanum cernuum*, *Colletotrichum musae*, *Fusarium*, *Penicillium*

INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais no mundo contribui significativamente para os cuidados primários da saúde (HALBERSTEIN, 2005). O uso de extratos de plantas e fitoquímicos com fins terapêuticos é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) estima-se que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependem das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (SIMÕES et al., 2007).

Os desafios no tratamento de doenças infecciosas vêm crescendo de forma significativa, tendo em vista que bactérias resistentes a múltiplos antimicrobianos representam fonte de incertezas para a cura dessas enfermidades (GONÇALVES et al., 2011). Geneticamente, as bactérias adquirem e transmitem resistência a antibióticos, assim como também a agroquímicos (SILVA et al., 2010).

Considerando que, a maioria das perdas econômicas em culturas acontece com o ataque de fungos, bactérias e vírus, métodos que visam mitigar tais perdas na produção e produtividade são de extrema importância (SANTOS et al., 2010). Atualmente o uso de métodos alternativos para o controle de doenças e pragas na agricultura, visando minimizar os danos ao meio ambiente e à saúde pública é prática reconhecida e necessária. O desenvolvimento de pesquisas com plantas medicinais representa uma possibilidade de substituir o uso de agroquímicos por outros produtos e contribuição na busca de novas entidades químicas ativas (COSTA et al., 2011). Estudos realizados com extratos brutos e/ou óleos essenciais obtidos a partir de plantas medicinais têm evidenciado o potencial das mesmas no controle de fitopatógenos (PERES et al., 2009).

Diversos são os fungos fitopatogênicos que atacam diferentes culturas. As podridões constituem-se a principal causa de danos pós-colheita (FISCHER et al., 2008). Segundo BASTOS & ALBUQUERQUE (2004), a antracnose é uma doença de pós-colheita, de grande importância, que ataca os frutos de banana (*Musa* spp.), sendo causada por *Colletotrichum musae* (Berk. & Curtis) Arx., um fungo fitopatogênico. O *Penicillium* sp. é o agente da podridão pós-colheita em frutos de laranja (ZAMBOLIM et al., 2002). De acordo com FISCHER et al. (2008), o bolor verde [*Penicillium digitatum* (Pers.:Fr.) Sacc.] é considerado a principal doença pós-colheita dos citros e está disseminada em todos os países produtores. Já os fungos *Fusarium solani* f. sp. Phaseoli e o *Fusarium solani* f. sp. piperis Alb., são responsáveis, respectivamente pela podridão-radicular do feijoeiro e pela fusariose da pimenta-do-reino (MIRANDA et al., 2007; EPAMIG, 2010).

A espécie *Solanum cernuum* Vell é uma Solanaceae, tipicamente brasileira, que recebe diversos nomes vulgares, tais como: barba-de-bode, bolsa-de-pastor, braço-de-preguiça, braço-de-momo, capoeira-branca, folha-de-onça, mercúrio-de-pobre, panacéia, velame, velame-de-folha-grande, velame-do-campo (SIQUEIRA-JACCOUD, 1963). É uma árvore de 2 a 6 m, relativamente comum nos remanescentes da floresta atlântica do sudeste de Minas Gerais (COSTA, 2004). Na

medicina popular, são atribuídas diversas atividades farmacológicas, sendo utilizada da folha às raízes, como diurético, depurativo, desobstruente, sendo também indicada para distúrbios hepáticos, gonorréias, sarna, úlceras cutâneas, dentre vários outros (CORRÊA, 1984; FERREIRA, 1975).

Como não existem muitos dados na literatura relativos a estudos de atividade antimicrobiana de *Solanum cernuum* Vell, e por sua ampla utilização na medicina popular, a mesma foi escolhida para o estudo, cujo objetivo foi testar a sensibilidade de cepas de bactérias e fungos fitopatogênicos frente ao extrato hexânico de *Solanum cernuum* Vell.



Figura 1. *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae)

Fonte: Os autores

METODOLOGIA

Obtenção do extrato hexânico

O *Solanum cernuum* Vell foi cultivado no Centro Comunitário Franco Rosseti em Pedro Canário – ES. As folhas foram coletadas, devidamente lavadas e secadas em estufa 40 ± 5 °C (SIMÕES et al., 2007).

Segundo metodologia proposta por SIMÕES et al. (2007), o extrato hexânico das folhas de *Solanum cernuum* Vell foi obtido por turboextração, a partir de 100g da planta seca. Após filtrado, o extrato foi concentrado em rotavapor, refrigerado e liofilizado.

Determinação do potencial antimicrobiano

Para determinação do potencial antibacteriano, os testes foram realizados por microdiluição em caldo Mueller-Hinton, utilizando placas de ELISA, conforme metodologias padrões para bactérias (NCCLS, 2003). As placas contêm 96 poços, onde foram realizadas diluições sucessivas partindo da concentração inicial de 1000,0 µg/mL até a concentração final de 3,9 µg/mL da droga. Os testes foram realizados para as cepas dos seguintes microrganismos: *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus aureus* (isolada do Hospital Estadual Dr. Roberto Arnizaut Silvaes, São Mateus, ES) e *Bacillus cereus* (ATCC 11778). Para garantir que não houvesse contaminantes, os três últimos poços foram destinados ao controle do meio, da droga e do microrganismo. O controle positivo foi realizado com os antibióticos ceftriaxona (30 µg/mL) e

vancomicina (30 µg/mL) (Quadro 1). O experimento foi realizado em quintuplicata para a mesma concentração, com três repetições. As placas foram acondicionadas em estufa bacteriológica (câmara úmida) por 24 horas em temperatura de 35 ± 2 °C, e a leitura de se deu de forma visual. A concentração bactericida mínima (CBM) é determinada utilizando placas de Petri para os poços da microplaca que não se observa crescimento bacteriano.

A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para os fungos foi realizada conforme protocolo (NCCLS, 2002). Os testes com fungos foram realizados em microplacas, com 96 poços, onde foram feitas microdiluições em caldo Sabouraud Dextrose, partindo da concentração de 1000,0 µg/mL até a concentração final de 3,9 µg/mL do extrato ou droga, conforme realizado para as bactérias. Foram utilizados os fungos fitopatogênicos: *Colletotrichum musae*, *Fusarium solani* f. sp. Phaseoli, *Fusarium solani* f. sp. piperis Alb. e *Penicillium* sp.

Para garantir que nenhum contaminante pudesse interferir nos testes, foram executados controle do meio, da droga e do fungo. O controle positivo foi realizado com o antifúngico cetoconazol (50 µg/mL). A incubação se deu em estufa bacteriológica (câmara úmida), por 46-50 horas, em uma temperatura de 27 ± 1 °C, onde a CIM foi obtida pela observação da ausência de crescimento na menor concentração da droga capaz de inibir o crescimento microbiano in vitro. A concentração fungicida mínima (CFM) foi determinada utilizando placas de Petri para os poços da microplaca que não se observou crescimento fúngico.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio dos resultados obtidos através dos ensaios biológicos *in vitro* com o extrato hexânico de *Solanum cernuum* Vell, verificou-se atividade inibitória do crescimento de todos os 4 fungos testados, *Colletotrichum musae*, *Fusarium solani* f. sp. Phaseoli, *Fusarium solani* f. sp. piperis Alb. e *Penicillium* sp., com CIM igual a 125,0 µg/mL, 62,5 µg/mL, 250,0 µg/mL e 250,0 µg/mL, respectivamente. A determinação da CFM foi determinada em placa de Petri, e os resultados encontram-se no Quadro 1.

Os fungos fitopatogênicos testados são de extrema importância para a agricultura, sendo o *Colletotrichum musae*, causador da podridão pós-colheita da banana; *Fusarium solani* f. sp. Phaseoli, causador da podridão-radicular do feijoeiro; *Fusarium solani* f. sp. piperis Alb., causador da fusariose da pimenta-do-reino; e *Penicillium* sp, causador da podridão pós-colheita em frutos de laranja. A existência de drogas naturais efetivas para erradicar “pragas” da agricultura é de extrema relevância, visto que a grande maioria das drogas hoje existentes e comumente utilizadas podem levar a prejuízos a saúde humana.

Quadro 1. Resultados dos testes de avaliação pelo método de placas de microdiluição da atividade do extrato hexânico de *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae) contra fungos fitopatogênicos

Substância (µg/mL)	<i>C.musae</i>		<i>Penicillium</i> sp		<i>F. solani</i> f. sp. Phaseoli		<i>F. solani</i> f. sp. piperis Alb.	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Controle ¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle ²	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle ³	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato ⁴	125,0	125,0	250,0	250,0	62,5	125,0	250,0	500,0
Cetoconazol ⁵	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Controle do extrato/droga; ²Controle microorganismo; ³Controle caldo Sabouraud; ⁴Extrato aquoso nas concentrações 1000,0 a 3,9 µg/mL; ⁵Controle antifúngico 50 µg/mL; (-) Ausência de crescimento microbiano, (+) Crescimento microbiano.

Em estudo realizado por MORAES et al. (2006), foi detectado que o *Colletotrichum musae* e o *Penicillium* sp. estavam dentre os fungos mais freqüentes, tanto em fungos verdes como em maduros.

Dentre os potenciais de inibição, nota-se menor CIM para o *Fusarium solani* sp. Phaseoli, ou seja, uma menor concentração da droga é eficaz para interferir no crescimento do fungo. Segundo BIANCHINI et al. (1997), a podridão radicular seca do feijoeiro comum, cujo agente causal é o fungo *Fusarium solani* (Mart.) Hans f. sp. Phaseoli, ocorre tanto na Europa como na América, onde já foram constatadas reduções de até 86% na produção em situações de limitado crescimento radicular.

Hoje, a busca por formas alternativas de controle de pragas na agricultura é necessária e constante. Diversos são os estudos paralelos que buscam novos fungicidas naturais. Em estudo com *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (Asteraceae), Pacheco et al. (2011) determinaram a atividade antifúngica do extrato aquoso em testes com fungos *Colletotrichum musae* (Berk. & Curt.) Arx e *Fusarium solani* sp., com CIM igual a 15,6 µg/mL e 125,0 µg/mL, respectivamente. Em estudo realizado por BASTOS & ALBUQUERQUE (2004), verificou-se atividade inibitória do óleo de *Piper aduncum* frente ao *Colletotrichum musae*, nas concentrações de 100,0 µg/mL e 150,0 µg/mL.

Conforme Quadro 2, não foi observada inibição das cepas de *E. coli* (ATCC 8739); *S. aureus* (ATCC 25923); *S. aureus* (Hospitalar) e *B. cereus* (ATCC 11778) com a droga. No entanto, observou-se uma pequena redução no crescimento de *E. coli* (ATCC 8739) na concentração de 1000,0 µg/mL.

Quadro 2. Esquema do método de microdiluição em microplaca para cultura microbiana

	1000,0 µg/mL	500,0 µg/mL	250,0 µg/mL	125,0 µg/mL	62,5 µg/mL	31,25 µg/mL	15,6 µg/mL	7,8 µg/mL	3,9 µg/mL	CB	CM	CD
A	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	MB	M	MD
B	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	MB	M	MD
C	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	MB	M	MD
D	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	MB	M	MD
E	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	DMB	MB	M	MD
F	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP			
G	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP			
H	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP	CP			

DMB = Droga(ou Extrato) + Meio + Bactéria; CB = Controle da Bactéria; MB = Meio + Bactéria; CM = Controle do Meio; M = Meio; CD = Controle da Droga; MD = Meio + Droga; CP = Controle Positivo

Quadro 3. Atividade antibacteriana do extrato hexânico de *Solanum cernuum* Vell. (Solanaceae) contra bactérias patogênicas, determinada pelo método de microdiluição, nas concentrações 1000,0 a 3,9 µg/mL

Substância (µg/mL)	<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>S. aureus</i>		<i>B. cereus</i>	
	ATCC 8739		ATCC 25923		Hospitalar		ATCC 11778	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Controle ¹	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle ²	+	+	+	+	+	+	+	+
Controle ³	-	-	-	-	-	-	-	-
Extrato	+	+	+	+	+	+	+	+
Ceftriaxona ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-
Vancomicina ⁴	-	-	-	-	-	-	-	-

¹Controle do extrato/droga; ²Controle microorganismo; ³Controle caldo Müeller-Hinton; ⁴Controle antibacteriano ceftriaxona (30 µg/mL) e vancomicina (30 µg/mL); (-) Ausência de crescimento bacteriano, (+) Crescimento bacteriano; ATCC: America Type Culture Collection

Embora o extrato não tenha mostrado efetiva atividade antibacteriana nas concentrações testadas, notou-se uma redução no crescimento de *E. coli* (ATCC 8739) na concentração de 1000,0 µg/mL, o que pode sugerir que em concentrações mais elevadas o extrato hexânico de *Solanum cernuum* Vell (Solanaceae) pode apresentar alguma atividade bactericida ou bacteriostática. Em relação às outras cepas, o crescimento foi o mesmo em todas as concentrações, e se comparado ao poço controle do microorganismo, nota-se que a droga não apresentou nenhum tipo de atividade, o que não exclui a possibilidade de que em concentrações mais elevadas possa apresentar alguma influencia sobre o crescimento das cepas testadas.

CONCLUSÕES

Tendo em vista os resultados obtidos, o extrato hexânico de *Solanum cernuum* Vell pode vir a ser utilizado como uma alternativa no controle da podridão pós-colheita causada pelos fungos testados, se enquadrando em estratégias de controle biológico de patógenos em plantas. O uso na agricultura deve ainda ser avaliado, para garantir que não ocorram modificações nas características dos produtos. Embora a *Solanum cernuum* Vell já seja amplamente utilizada na medicina popular, a toxicidade do extrato ainda deve ser avaliado, para garantir, que nessas concentrações, não cause prejuízos à saúde humana.

Embora não se tenha determinada a CIM e a CBM para as cepas de bactérias testadas, notou-se redução do crescimento microbiano, com decréscimo da turbidez do meio com o aumento da concentração do extrato.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq, FAPES, CAPES, BNB e UFES (PROEx e PRPPG) pela concessão de bolsas e suporte financeiro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BASTOS, C. N.; ALBUQUERQUE, P. S. B. Efeito do óleo de *Piper aduncum* no controle em pós-colheita de *Colletotricum musae* em banana. **Fitopatologia Brasileira**, v. 29, n. 5, p. 555–557, 2004.

BIANCHINI, A.; MARINGONI, A. C.; CARNEIRO, S. M. T. P. G. Doenças do Feijoeiro. In: KIMATI, H.; AMORIN, L.; BERGAMIN, F. A., CAMARGO, L. E. A.; REZENDE, J. A. (Eds.) **Manual de Fitopatologia**. 3. ed. Viçosa: Ceres, 1997. p. 376-405.

CORRÊA, M. P. **Dicionário das Plantas Úteis do Brasil e das Exóticas Cultivadas**. **Imprensa Nacional**, Rio de Janeiro, 1984, p. 325.

COSTA, A. R. T et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 240–245, 2011.

COSTA, F. A. P. L. **Demografia foliar**: contando folhas no braço-de-preguiça, La Insígnia. Brasil, 2004.

EPAMIG. **Guia técnico** - produção de feijão. EPAMIG, 2010. 52p.

FERREIRA, A. B. H. **Novo Dicionário da Língua Portuguesa**. Rio de Janeiro: Ed. Nova Fronteira, 1975. p. 1032.

FISCHER, I. H.; LOURENCO, S. A.; AMORIM, L. Doenças pós-colheita em citros e caracterização da população fúngica ambiental no mercado atacadista de São Paulo. **Tropical Plant Pathology**, v. 33, n. 3, p. 219 – 226, 2008.

GONÇALVES, D. M. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Tabernaemontana catharinensis* A. DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 197–202, 2011.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, n. 9, p. 686-699, 2005.

MIRANDA, B. A.; LOBO JUNIOR, M.; CUNHA, M. G. Reação de cultivares do feijoeiro comum as podridões radiculares causadas por *Rhizoctonia solani* e *Fusarium solani* f. sp. Phaseoli. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 37, n. 4, p. 221-226, 2007.

MORAES, W. S.; ZAMBOLIM, L.; LIMA, J. D.. Incidência de fungos em pós-colheita de banana 'Prata anã' (*Musa AAB*). **Summa phytopathologica**, v. 32, n. 1, p. 67-70, 2006.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **M38-A**. Método de referência para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica de fungos filamentosos. v. 22, n. 16, p. 1-50, 2002.

NCCLS. NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **M7-A6**. Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico. v. 23, n. 2, p. 1-48, 2003.

PACHECO, T. F. et al. AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DE EXTRATO AQUOSO DE *Emilia sonchifolia* (L.) DC. (ASTERACEAE). **Enciclopedia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1–8, 2011.

PERES, R. L. et al. *Achillea Millefolium* – Asteraceae: Estudo Fitoquímico, espectrofotométrico e da atividade antifúngica (*Colletotrichum musae*). **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 81–93, 2009.

SANTOS, M. B. et al. Efeito inibitório *in vitro* de extrato vegetal de *Allium sativum* sobre *Aspergillus niger* Tiegh. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 1, p. 13–17, 2010.

SILVA, L. L. S. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth, Fabaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 2, p. 208-214, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Florianópolis: UFSC, p. 1102, 2007.

SIQUEIRA-JACCOUD, R. J. **Contribuição ao Estudo Farmacognóstico do *Solanum cernuum* Velozzo**". 1963, 56 p. Tese (Livre-Docência) - Faculdade Nacional de Farmácia, Universidade do Brasil, São Paulo.

ZAMBOLIM, L.; VALE, F. X. R.; MONTEIRO, A. J. A.; COSTA, H. **Controle de doenças de plantas: Fruteiras**. Viçosa: Ed. UFV, 2002. v. 2. 1313p.

