

## Efeito dos extratos das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. sobre bactérias resistentes a multidrogas

### Effect of leaf extracts of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. against multidrug resistant bacteria

Michele Cezimbra Perim<sup>I</sup>, Joelma da Costa Borges<sup>I</sup>, Thiago Antônio de Sousa Araújo<sup>I,II</sup>, Ana Carolina Oliveira da Silva<sup>III</sup>, Natália Mazzolani Zucchini<sup>IV</sup>, Solange Cristina Carreiro<sup>I</sup>, Anderson Ferreira da Cunha<sup>IV</sup>, Maria Cristina da Silva Pranchevicius<sup>I,IV</sup>

<sup>I</sup>Universidade Federal do Tocantins. Palmas, Tocantins, Brasil

<sup>II</sup>Universidade Federal de Pernambuco. Recife, Pernambuco, Brasil

<sup>III</sup>Hospital de Base do Distrito Federal. Brasília, Distrito Federal, Brasil

<sup>IV</sup>Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, São Paulo, Brasil

**Resumo:** As plantas medicinais são fontes de moléculas bioativas que podem ser utilizadas contra infecções bacterianas. Neste estudo, avaliou-se a atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. contra 68 bactérias resistentes a multidrogas, isoladas de pacientes diabéticos com lesões nos pés, e de seis cepas de referência da *American Type Culture Collection*, através dos métodos de disco difusão em ágar (DD) e de microdiluição em caldo (MC). Realizou-se também a correlação entre o extrato e os antibióticos cefoxitina ou amoxicilina/ácido clavulânico. O extrato das folhas apresentou atividade antimicrobiana em ambos os métodos, no entanto, o método MC foi mais sensível na menor diluição (0,039 mg/mL) utilizada. Cepas comumente isoladas nesses tipos de lesões foram inibidas pelo extrato, como *Staphylococcus aureus* (40,91%), *Staphylococcus saprophyticus* (42,86%), *Streptococcus pyogenes* (100,00%), *Streptococcus agalactiae* (50,00%), *Enterobacter* spp. (33,33%), *Pseudomonas* spp. (66,67%) e *Proteus* spp. (28,57%). A associação do extrato com os antibióticos não potencializou a atividade antibacteriana, sugerindo que eles possuem mecanismos de ação independentes. Nossos resultados mostraram que o extrato etanólico das folhas possui uma boa atividade antimicrobiana. No entanto, estudos adicionais devem ser realizados para determinar a eficácia e a toxicidade dele no tratamento de infecções bacterianas.

**Palavras-chave:** *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. Atividade antimicrobiana. Bactérias resistentes a multidrogas.

**Abstract:** Medicinal plants are sources of bioactive molecules that can be used against bacterial infections. In this study, the antibacterial activity of the ethanolic extract of the leaves of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. was tested against 68 multidrug-resistant bacteria, isolated from diabetic patients with foot lesions, and six reference strains of the American Type Culture Collection, using agar diffusion (DD) and broth microdilution (MC) methods. The correlation between plant extract and cefoxitin or amoxicillin/clavulanic acid antibiotics was also performed. Leaf extract presented antimicrobial activity in both methods, however, the MC method was more sensitive at the lower dilution (0,039 mg/mL) used. In these types of lesions, the strains more frequently found were inhibited by ethanolic extract, such as *Staphylococcus aureus* (40,91%), *Staphylococcus saprophyticus* (42,86%), *Streptococcus pyogenes* (100,00%), *Streptococcus agalactiae* (50,00%), *Enterobacter* spp. (33,33%), *Pseudomonas* spp. (66,67%), *Proteus* spp. (28,57%). The association of extract with antibiotics did not potentiate the antibacterial activity, it suggested that extract and antibiotics have different mechanisms of actions. Our results showed that the ethanolic extract of the leaves of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. has a good antimicrobial activity. However, additional studies should be performed to determine its efficacy and toxicity in the treatment of bacterial infections.

**Keywords:** *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. Antimicrobial activity. Multidrug resistant bacteria.

---

PERIM, M. C., J. C. BORGES, T. A. S. ARAÚJO, A. C. O. SILVA, N. M. ZUCCHINI, S. C. CARREIRO, A. F. CUNHA & M. C. S. PRANCHEVICIUS, 2019. Efeito dos extratos das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Per. sobre bactérias resistentes a multidrogas. **Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Ciências Naturais** 14(1): 91-99.

Autora para correspondência: Maria Cristina da Silva Pranchevicius. Universidade Federal de São Carlos. Departamento de Genética e Evolução. Rod. Washington Luis, km 235. São Carlos, SP, Brasil. CEP 13565-905 (mcspranc@gmail.com).

Recebido em 30/10/2017

Aprovado em 24/09/2018

Responsabilidade editorial: Fernando da Silva Carvalho Filho



## INTRODUÇÃO

As bactérias patogênicas são consideradas uma das maiores causas de morbidade e mortalidade em humanos (Djeussi *et al.*, 2011), e as infecções ocasionadas por esses tipos de patógenos provocam um grande problema de saúde pública. Organismos resistentes a multidrogas são comuns em pacientes diabéticos com úlceras nos pés (Lipsky, 2007) e constituem grande ameaça ao tratamento (Gadepalli *et al.*, 2006; Ramakant *et al.*, 2011).

Algumas espécies de plantas são comumente usadas como fitoterápicos, pois possuem componentes biologicamente ativos com potencial para exercer atividades no tratamento de doenças e também com funções antimicrobianas (Adebisi, 1999; Chouna *et al.*, 2009; Kuete, 2010). *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (sinônimo: *Bryophyllum pinnatum* Lamark, 1786) é um membro da família Crassulaceae. A planta é comumente distribuída em várias regiões (Allorge-Boiteau, 1996; Judd *et al.*, 2009), sendo usada na medicina popular da África tropical, da Índia, da China, da Austrália, da América tropical, de Madagascar, da Ásia e do Havai (Yadav & Dixit, 2003) para tratar várias doenças e infecções, como hipertensão, distúrbios renais e urinários (Lans, 2006), diarreia, flatulência e vômitos (Kamboj & Saluja, 2009), tosse, bem como na profilaxia da asma (Salami *et al.*, 2013), de icterícia (Yadav & Dixit, 2003), de feridas, de contusões e de picadas de insetos (Kirtikar & Basu, 1975; Pal & Nag Chaudhuri, 1991).

Nessa planta, foram identificadas várias substâncias fitoquímicas, como alcaloides, fenóis, flavonoides, saponinas, taninos, triterpenoides, glicosídeos, carboidratos, esteróis e aminoácidos (Matthew *et al.*, 2013a). Esses componentes químicos são responsáveis por vários efeitos (Rajsekhar *et al.*, 2016): antiprotozoário, antileishmanial (Willcox & Bodeker, 2004; Muzitano *et al.*, 2006, 2009), anti-helmíntico (Quazi Majaz *et al.*, 2011), anticancerígeno (Devbhuti *et al.*, 2012; Mahata *et al.*, 2012), antimicrobiano (Akinpelu, 2000; Okwu & Nnamdi, 2011a, 2011b), antiviral (Supratman *et al.*, 2001; Mahata *et al.*, 2012), antialérgico

(Cruz *et al.*, 2008, 2012), analgésico (Afzal *et al.*, 2012), antipirético (Biswas & Mondal, 2015), anti-hipertensivo (Ojewole, 2002; Ghasi *et al.*, 2011; Bopda *et al.*, 2014), antidiabético (Goyal *et al.*, 2013; Matthew *et al.*, 2013b), hepatoprotetor (Yadav & Dixit, 2003; Afzal *et al.*, 2013), gastroprotetor (Pal & Nag Chaudhuri, 1991; Sharma *et al.*, 2014), entre outros.

Considerando-se que existem poucos estudos sobre as atividades terapêuticas dos extratos de *Kalanchoe pinnata*, coletada no estado do Tocantins, o presente artigo analisou a atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas dessa planta contra bactérias resistentes a multidrogas, isoladas de pacientes diabéticos com lesões nos pés, e também de cepas do *American Type Culture Collection* (ATCC).

## MATERIAL E MÉTODOS

### DESENHO DO ESTUDO

O extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. foi avaliado contra um total de 68 cepas bacterianas *Citrobacter* spp. (Werkman & Gillen, 1932); *Escherichia coli* (T. Escherich, 1885), *Enterobacter* spp. (Hormaeche & Edwards, 1960), *Proteus* spp. (Hauser, 1885), *Pseudomonas* spp. (Migula, 1894), *Streptococcus agalactiae* (Lehmann & Neumann, 1896) (alfa-hemolítico), *Streptococcus pneumoniae* (Chester, 1901) (beta-hemolítico), *Staphylococcus epidermidis* (Evans, 1916), *Staphylococcus saprophyticus* (Shaw *et al.*, 1951), *Staphylococcus aureus* (Rosenbach, 1884), isoladas de pacientes diabéticos com úlceras nos pés, internados no Hospital Geral Público de Palmas Doutor Francisco Ayres (HGP), em Tocantins, Brasil, entre janeiro a junho de 2013 (Perim *et al.*, 2015), e seis cepas de bactérias *Escherichia coli* (ATCC-25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853), *Proteus mirabilis* (ATCC-12453), *Citrobacter youngae* (ATCC-29935), *Staphylococcus aureus* (ATCC-25923), *Streptococcus pyogenes* (ATCC-0015), obtidas do *American Type Culture Collection* (ATCC).

## COLETA DO ESPÉCIME VEGETAL E PREPARO DO EXTRATO DAS FOLHAS

Para a preparação dos exemplares depositados em coleções (*voucher specimens*) e para a produção dos extratos, as folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. foram coletadas de janeiro a junho de 2013, na cidade de Palmas, estado do Tocantins, Brasil (10° 10' 58,45" S e 48° 17' 33,75" O). A planta foi caracterizada e autenticada no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), Brasil. O *voucher specimens* (HUFU 71.870) foi preparado e depositado no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (HUFU), no Brasil.

As partes vegetais coletadas foram secas em estufa com circulação de ar e temperatura média de  $40 \pm 2$  °C. Em seguida, foram pulverizadas em moinho vertical de facas tipo Willye e padronizadas em tamises, obtendo-se granulometria de 1 mm (16 Mesh). Os extratos foram preparados por maceração com etanol 95%, por 24 horas, na proporção de 1:20 (p/v). Após a maceração, o material foi filtrado em papel-filtro e evaporado sob pressão reduzida, à temperatura de  $40 \pm 2$  °C, até que houvesse a produção de um extrato seco (Araújo *et al.*, 2012).

## PREPARO DA SUSPENSÃO BACTERIANA

As culturas bacterianas estavam preservadas em caldo Mueller Hinton (CMH) (Kasvi, Brasil), em *freezer* a -80 °C, no laboratório de cultura de células da Universidade Federal do Tocantins (UFT). As cepas bacterianas foram transferidas para tubos contendo caldo CHM, incubadas sem agitação por 24 h, a 37 °C. Em seguida, cada espécie bacteriana foi diluída com CMH fresco a uma densidade ótica de  $2,0 \times 10^6$  unidades formadoras de colônias (UFC).

## ENSAIO DE DIFUSÃO EM DISCO

O método de difusão em disco foi realizado conforme descrito por Duraipandiyar *et al.* (2006) e Arullappan *et al.* (2014). Em placas de Petri, contendo meio Ágar Mueller Hinton (AMH), cada suspensão bacteriana (1,0 mL) foi

uniformemente distribuída. Após cinco minutos, foram adicionados seis discos de papel branco estéril (Oxoid) (com 6,0 mm de diâmetro cada) na superfície do meio, impregnados com diferentes diluições (20 mg/mL a 0,039 mg/mL) do extrato da planta. Para controle negativo, foram usados discos impregnados com controle Dimetilsulfóxido (DMSO), enquanto que discos de cefoxitina (CFO) (3.000 mg/mL a 1,5 mg/mL) e discos de amoxicilina com ácido clavulânico (AAC) (2.000 mg/mL a 0,9 mg/mL) foram usados como controle positivo, para as bactérias gram-negativas e gram-positivas, respectivamente. As placas foram incubadas a 37 °C por até 48 horas. No final da incubação, as zonas de inibição formadas em volta dos discos foram medidas com paquímetro. Todos os testes foram feitos em triplicata, e a avaliação da atividade bacteriana foi realizada de acordo com o diâmetro do halo de inibição: 9-13 mm, moderadamente sensível;  $\geq 14$  mm, altamente sensível (Arora & Bhardwaj, 1997).

## DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada por meio da metodologia de microdiluição em caldo (MC) (Gahlaut & Chhillar, 2013). Todos os experimentos foram realizados em triplicata. A concentração dos extratos usados para validar a atividade antibacteriana foi de 20 a 0,039 mg/mL. Os antibióticos CFO e AAC, usados, respectivamente, como controle positivo para as bactérias gram-negativas e gram-positivas foram utilizados nas mesmas concentrações (de 20 a 0,039 mg/mL). DMSO foi utilizado como controle negativo.

## ANÁLISE ESTATÍSTICA

O processamento e as análises dos dados foram conduzidos por meio de ferramentas como Excel 2016, STATA 12 e Biostat. O coeficiente de correlação de Spearman e o teste exato de Fisher foram também utilizados, de acordo com os objetivos das análises e com a natureza dos dados, sendo considerados 5% de significância.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos estudos realizados por Perim *et al.* (2015), as cepas bacterianas analisadas foram caracterizadas como multirresistentes para a maioria dos antibióticos utilizados. Portanto, nesse estudo, a análise da atividade antibacteriana do extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. foi determinada pelos métodos de difusão em disco (DD) e de microdiluição em caldo (MC). Esta análise foi demonstrada na Tabela 1.

O extrato das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias testadas, tanto pelo método de difusão em disco (DD) (37,84%) quanto pelo de microdiluição em caldo (MC) (37,84%) (Tabela 1). Nossos resultados estão de acordo com outros estudos que evidenciam a atividade antibacteriana de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. contra um amplo grupo de bactérias (Akinpelu, 2000; Ofokansi *et al.*, 2005; Okwu & Nnamdi, 2011a).

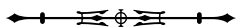
Estudos realizados por Akinpelu (2000), utilizando o método de difusão em ágar, demonstraram que o extrato metanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.

(a uma concentração de 25 mg/mL) possuiu maior atividade antibacteriana para as bactérias gram-positivas do que para as gram-negativas. Diferentemente, em nosso estudo, utilizando o método DD, o extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (a uma concentração de 20 mg/mL) inibiu tanto o crescimento de bactérias gram-negativas (n = 10; 38,46%) quanto de gram-positivas (n = 18; 37,50%) (Tabela 1). A atividade antibacteriana observada para as bactérias gram-negativas pode ser decorrente do ambiente em que esta planta foi coletada, pois plantas medicinais de diferentes ambientes produzem diversificados teores de compostos bioativos, resultando em respostas terapêuticas e atividades farmacológicas diversas (Dong *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2015).

Em nossos estudos, foi possível observar que pelos métodos MC e DD, até a última concentração do extrato (0,039 mg/mL), houve inibição do crescimento em ambos os grupos de bactérias, no entanto, o método MC foi mais eficiente tanto para as bactérias gram-negativas (26,92%) quanto para as gram-positivas (18,75%) (Tabela 1). Esses resultados podem ser

Tabela 1. Percentual de cepas sensíveis ao extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers., determinado pelos métodos de difusão em disco (DD) e microdiluição em caldo (MC). Legendas: n = número de linhagens analisadas; % = porcentagem.

DD (mg/mL)											
Bactérias	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	DMSO 100%
Gram-negativas	10	10	10	9	8	8	5	4	3	3	0
(n = 26)	38,46%	38,46%	38,46%	34,62%	30,77%	30,77%	19,23%	15,38%	11,54%	11,54%	0,00%
Gram-positivas	18	17	16	14	11	10	9	5	3	2	0
(n = 48)	37,50	35,42	33,33	29,17	22,92	20,83	18,75	10,42	6,25	4,17	0,00
Total	28	27	26	23	19	18	14	9	6	5	0
(n = 74)	37,84%	36,49%	35,14%	31,08%	25,68%	24,32%	18,92%	12,16%	8,11%	6,76%	0,00%
MC (mg/mL)											
Bactérias	20	10	5	2,5	1,25	0,625	0,312	0,156	0,078	0,039	DMSO 100%
Gram-negativas	9	9	9	8	8	8	8	7	7	7	0
(n = 26)	34,62%	34,62%	34,62%	30,77%	30,77%	30,77%	30,77%	26,92%	26,92%	26,92%	0,00%
Gram-positivas	19	19	17	17	13	13	13	13	11	9	0
(n = 48)	39,58%	39,58%	35,42%	35,42%	27,08%	27,08%	27,08%	27,08%	22,92%	18,75%	0,00%
Total	28	28	26	25	21	21	21	20	18	16	0
(n = 74)	37,84%	37,84%	35,14%	33,78%	28,38%	28,38%	28,38%	27,03%	24,32%	21,62%	0,00%



atribuídos à polaridade e a outros componentes que afetam a difusão de componentes bioativos em baixas concentrações do extrato (Klancnik *et al.*, 2010). Além disso, estudos sugerem que esse método é vantajoso para análises de produtos naturais (Salazar-Aranda *et al.*, 2009; Palombo, 2011), por ser rápido e viável para a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (Luber *et al.*, 2003).

Em úlceras nos pés de pacientes diabéticos, as bactérias mais comumente encontradas são as gram-negativas: *Enterococci*, *Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas aeruginosa* (Pathare *et al.*, 1998; Bansal *et al.*, 2008). Também são encontradas as gram-positivas: *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus* beta hemolítico (grupos A, C e G, especialmente o grupo B) (El-Tahawy, 2000; Urbancic-Rovan & Gubina, 2009).

Analisando os isolados bacterianos gram-negativos, a Tabela 2 demonstra que, tanto no método MC quanto no

DD, o extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers inibiu o crescimento de *Citrobacter* spp. (n = 01; 100,00%), *Citrobacter youngae* (ATCC-29935) (n = 01; 100,00%), *Enterobacter* spp. (n = 3; 33,33%), *Pseudomonas* spp. (n = 02; 66,67%) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC-27853) (n = 01; 100,00%). O extrato inibiu o crescimento de *Proteus* spp. em 28,57% (n = 02), pelo método DD, e em 14,29% (n = 1), pelo método MC. O extrato das folhas não inibiu o crescimento de *Proteus mirabilis* (n = 01; ATCC-1245), *Escherichia coli* (n = 02) e *Escherichia coli* (n = 01; ATCC-25922).

A Tabela 2 também demonstra a análise antibacteriana do extrato das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. contra as bactérias gram-positivas. Utilizando os métodos DD e MC, o extrato das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. também inibiu o crescimento de *Streptococcus agalactiae* (n = 01; 50,00%), *Streptococcus pneumoniae* (n = 03; 75,00%) e *Streptococcus pyogenes*

Tabela 2. Percentual de cepas sensíveis ao extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. contra bactérias multirresistentes, determinada pelos métodos de difusão em disco (DD) e de microdiluição em caldo (MC). A concentração dos extratos utilizados para analisar a atividade antimicrobiana foi de 20 (100,00%) a 0,039 (0,19%) mg/mL. Legenda: n = número de linhagens analisadas; % = porcentagem.

Bactérias		DD (%)	MC (%)
Gram-negativas (n = 26)	<i>Citrobacter</i> spp. (n = 01)	1 (100,00%)	1 (100,00%)
	<i>Citrobacter youngae</i> (ATCC-29935) (n = 01)	1 (100,00%)	1 (100,00%)
	<i>Escherichia coli</i> (n = 02)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC-25922) (n = 01)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
	<i>Enterobacter</i> spp. (n = 09)	3 (33,33%)	3 (33,33%)
	<i>Proteus</i> spp. (n = 07)	2 (28,57%)	1 (14,29%)
	<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC-1245) (n = 01)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
	<i>Pseudomonas</i> spp. (n = 03)	2 (66,67%)	2 (66,67%)
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC-27853) (n = 01)	1 (100,00%)	1 (100,00%)
Gram-positivas (n = 48)	<i>Streptococcus agalactiae</i> (beta hemolítico) (n = 02)	1 (50,00%)	1 (50,00%)
	<i>Streptococcus pneumoniae</i> (alfa hemolítico) (n = 04)	3 (75,00%)	3 (75,00%)
	<i>Streptococcus pyogenes</i> (ATCC-0015) (n = 01)	1 (100,00%)	1 (100,00%)
	<i>Staphylococcus epidermidis</i> (n = 04)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
	<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (n = 14)	6 (42,86%)	5 (35,71%)
	<i>Staphylococcus aureus</i> (n = 22)	7 (31,82%)	9 (40,91%)
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC-25923) (n = 01)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
Total (n = 74; 100%)		28 (37,84%)	28 (37,84%)



(Rosenbach, 1884) (n = 01; 100,00%). As cepas de *Staphylococcus saprophyticus* foram inibidas em 42,86% (n = 06) por DD e 35,71% (n = 05) por MC, e *Staphylococcus aureus* em 31,82% (n = 07) por DD e 40,91% (n = 09) por MC. O extrato não inibiu o crescimento de *Staphylococcus epidermidis* (n = 04) e de *Staphylococcus aureus* (n = 01; ATCC-25923). Nossos resultados estão parcialmente de acordo com alguns estudos (Akinpelu, 2000; Ofokansi *et al.*, 2005; Akinsulire *et al.*, 2007; Okwu & Nnamdi, 2011b) que demonstraram atividade antimicrobiana de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. contra *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* (Orla-Jensen, 1919; Schleifer & Kilpper-Bälz, 1984), *Bacillus subtilis* (Cohn, 1872), *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium* (Lignieres, 1900), *Klebsiella aerogenes* (Tindall *et al.*, 2017), *Klebsiella pneumoniae* (Trevisan, 1887) e *Pseudomonas aeruginosa* (Schroeter, 1872).

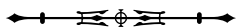
Estudos têm descrito vários compostos responsáveis pela ação antimicrobiana de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers., como os flavonoides 5'-metil 4',5,7-trihidroxilflavona e 4',3,5,7-tetrahidroxi 5'-metil 5'-propenamina antocianidinas e também fenantreno (Okwu & Nnamdi, 2011b),  $\alpha$ -rhamnoisorobin (23), kaempferol rhamnosideo (17, 19-22) (Tatsimo *et al.*, 2012).

Embora os compostos bioativos não tenham sido isolados, a atividade antimicrobiana dessa planta pode ser decorrente da presença desses e de outros compostos ainda não identificados. A presença desses compostos pode também justificar o uso popular dessa planta contra infecções cutâneas, abscessos e distúrbios gastrointestinais (Gill, 1992; Akinsulire *et al.*, 2007). No entanto, estudos adicionais devem ser realizados para isolar, validar e analisar a eficácia e a toxicidade desses componentes como agentes antibacterianos.

A Tabela 3 demonstra a correlação entre o extrato das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers., com os antibióticos cefoxitina (CFO) contra bactérias gram-negativas e amoxicilina com ácido clavulânico (AAC) contra bactérias gram-positivas. Foi observado que não houve correlação utilizando os extratos das folhas com os antibióticos CFO ou AAC, contra as bactérias gram-negativas ( $p = 0,598$ ) e gram-positivas ( $p = 0,768$ ), respectivamente. Apesar de alguns estudos demonstrarem efeitos aditivos ou sinérgicos entre antibióticos e extratos bioativos (Adwan & Mhanna, 2008), nossos resultados sugerem que os extratos das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. e os antibióticos testados possuem ações independentes para a inibição do crescimento desses tipos de bactérias.

Tabela 3. Análise estatística dos efeitos do extrato etanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. em combinação com antibióticos contra as bactérias multirresistentes. Legendas: CIM = concentração inibitória mínima; MC = microdiluição em caldo; AAC = amoxicilina com ácido clavulânico (2.000 mg/mL); CFO = cefoxitina (3.000 mg/mL). Teste exato de Fisher, nível de significância: p-valor  $\leq 0,05$ .

Antibiótico X Extrato das folhas			
Gram -/CIM-MC	Extrato das folhas		Total
CFO	Resistente	Sensível	
Resistente	11	11	22
Sensível	1	3	4
Total ( $p = 0,598261$ )	12	14	26
Antibiótico X Extrato das folhas			
Gram +/CIM-MC	Extrato das folhas		Total
AAC	Resistente	Sensível	
Resistente	13	16	29
Sensível	10	9	19
Total ( $p = 0,768564$ )	23	25	48



## CONCLUSÃO

Este estudo demonstrou uma satisfatória atividade antibacteriana dos extratos das folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. contra as bactérias multidrogas resistentes, isoladas de pacientes diabéticos com lesões nos pés. Os resultados sugerem que essas folhas possuem compostos bioativos contra bactérias gram-negativas e gram-positivas. No entanto, estudos mais aprofundados que visem o isolamento e a caracterização desses compostos bioativos são necessários para avaliar sua eficácia e sua segurança como novos agentes antibacterianos.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Secretaria de Saúde do Estado do Tocantins (SESAU-TO) e a Thiago de Cesaro por facilitar o desenvolvimento do projeto; ao Laboratório Central de Saúde Pública do Tocantins (LACEN-TO), que gentilmente forneceu as cepas de controles. Este trabalho recebeu suporte financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) (AUX-PE-PNPD 2535/2011, processo 23038.007229/2011/12) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) (Universal, processo 485873/2013-3).

## REFERÊNCIAS

ADEBISI, L. A., 1999. **Biodiversity conservation and ethnobotany of selected sacred groves in Osun State, Department of Forest Resources Management**: 1-198. Tese (Philosophy, Biodiversity, Conservation and Ethnobotany) – University of Ibadan, Nigeria.

ADWAN, G. & M. MHANNA, 2008. Staphylococcus aureus strains isolated from clinical specimens. **Middle-East Journal of Scientific Research** 3(3): 134-139.

AFZAL, M., G. GUPTA, I. KAZMI, M. RAHMAN, O. AFZAL, J. ALAM, K. R. HAKEEM, M. PRAVEZ, R. GUPTA & F. ANWAR, 2012. Anti-inflammatory and analgesic potential of a novel steroidal derivative from *Bryophyllum pinnatum*. **Fitoterapia** 83: 853-858. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2012.03.013>.

AFZAL, M., I. KAZMI & F. ANWAR, 2013. Antineoplastic potential of *Bryophyllum pinnatum* Lam. on chemically induced hepatocarcinogenesis in rats. **Pharmacognosy Research** 5(4): 247-253. DOI: <https://doi.org/10.4103/0974-8490.118811>.

AKINPELU, D. A., 2000. Antimicrobial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaves. **Fitoterapia** 71(2): 193-194.

AKINSULIRE, O. R., I. E. AIBINU, T. ADENIPEKUN, T. ADELOWOTAN & T. ODUGBEMI, 2007. In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines** 4(3): 338-344.

ALLORGE-BOITEAU, L., 1996. Madagascar centre de speciation et d'origine du genre *Kalanchoe* (Crassulaceae). In: W. R. LOURENÇO (Ed.): **Biogéographie de Madagascar**: 137-145. Éditions de l'ORSTOM, Paris.

ARAÚJO, T. A. S., V. T. C. ALMEIDA, E. L. C. AMORIM & U. P. ALBUQUERQUE, 2012. Habitat influence on antioxidant activity and tannin concentrations of *Spondiastuberosa Arruda* (Anacardiaceae). **Pharmaceutical Biology** 50(6): 754-759. DOI: <https://doi.org/10.3109/13880209.2011.630673>.

ARORA, D. S. & S. K. BHARDWAJ, 1997. Antibacterial activity of some medicinal plants. **Geo Bios** 24: 127-131.

ARULLAPPAN, S., P. RAJAMANICKAM, N. THEVAR & C. C. KODIMANI, 2014. In vitro screening of cytotoxic, antimicrobial and antioxidant activities of *Clinacanthus nutans* (Acanthaceae) leaf extracts. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research** 13(9): 1455-1461. DOI: <https://doi.org/10.4314/tjpr.v13i9.11>.

BANSAL, E., A. GARG, S. BHATIA, A. K. ATTRI & J. CHANDER, 2008. Spectrum of microbial flora in diabetic foot ulcers. **Indian Journal of Pathology & Microbiology** 51(2): 204-208.

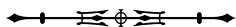
BISWAS, D. & T. K. MONDAL, 2015. Evaluation of anti-pyretic activity of hydroalcoholic extract of *Kalanchoe pinnata* leaves against yeast-induced pyrexia in rat. **International Journal Innovative Pharmaceutical Sciences and Research** 3(5): 483-492.

BOPDA, O. S., F. LONGO, T. N. BELLA, P. M. EDZAH, G. S. TAÏWE, D. C. BILANDA, E. N. TOM, P. KAMTCHOUING & T. DIMO, 2014. Antihypertensive activities of the aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* (Crassulaceae) in high salt-loaded rats. **Journal of Ethnopharmacology** 153(2): 400-407. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2014.02.041>.

CHOUNA, J. R., P. A. NKENG-EFOUET, B. N. LENTA, P. K. DEVKOTA, B. NEUMANN, H. G. STAMM LER, S. F. KIMBU & N. SEWALD, 2009. Antibacterial endiandric acid derivatives from *Beilschmiedia anacardioides*. **Phytochemistry** 70(5): 684-688. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.02.012>.

CRUZ, E. A., S. A. G. DA-SILVA, M. F. MUZITANO, P. M. R. SILVA, S. S. COSTA & B. ROSSI-BERGMANN, 2008. Immunomodulatory pretreatment with *Kalanchoe pinnata* extract and its quercetin flavonoid effectively protects mice against fatal anaphylactic shock. **International Immunopharmacology** 8(12): 1616-1621. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2008.07.006>.

- CRUZ, E. A., S. REUTER, H. MARTIN, N. DEHZAD, M. F. MUZITANO, S. S. COSTA, B. ROSSI-BERGMANN, R. BUHL, M. STASSEND & C. TAUBE, 2012. *Kalanchoe pinnata* inhibits mast cell activation and prevents allergic airway disease. **Phytomedicine** 19(2): 115-121. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.06.030>.
- DEVBHUTI, D., J. K. GUPTA & P. DEVBHUTI, 2012. Studies on antitumour activity of *Bryophyllum calycinum* Salisb. against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss Albino mice. **Journal of Pharmaceutical Science and Technology** 2(1): 31-33.
- DJEUSSI, D. E., J. A. K. NOUMEDEM, J. A. SEUKEP, A. G. FANKAM, I. K. VOUKENG, J. E. DONG, X. H. MA, Q. WEI, S. B. PENG & S. C. ZHANG, 2011. Effects of growing location on the contents of secondary metabolites in the leaves of four selected superior clones of *Eucommia ulmoides*. **Industrial Crops and Products** 34(3): 1607-1614. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.007>.
- DONG, J. E., X. H. MA, Q. WEI, S. B. PENG & S. C. ZHANG, 2011. Effects of growing location on the contents of secondary metabolites in the leaves of four selected superior clones of *Eucommia ulmoides*. **Industrial Crops and Products** 34(3): 1607-1614. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2011.06.007>.
- DURAI PANDIYAN, V., M. AYYANAR & S. IGNACIMUTHU, 2006. Antimicrobial activity of some ethnomedicinal plants used by Paliyar tribe from Tamil Nadu, India. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 6: 35. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-6-35>.
- EL-TAHAWY, A. T., 2000. Bacteriology of diabetic foot. **Saudi Medical Journal** 21(4): 344-347.
- GADEPALLI, R., B. DHAWAN, V. SREENIVAS, A. KAPIL, A. C. AMMINI & R. CHAUDHRY, 2006. A clinico-microbiological study of diabetic foot ulcers in an Indian tertiary care hospital. **Diabetes Care** 29(8): 1727-1732. DOI: <https://doi.org/10.2337/dc06-0116>.
- GAHLAUT, A. & A. K. CHHILLAR, 2013. Evaluation of antibacterial potential of plant extracts using resazurin based microtiter dilution assay. **International Journal Pharmacology and Pharmacy Science** 5(2): 372-376.
- GHASI, S., C. EGWUIBE, P. U. ACHUKWU & J. C. ONYEANUSI, 2011. Assessment of the medical benefit in the folkloric use of *Bryophyllum pinnatum* leaf among the Igbos of Nigeria for the treatment of hypertension. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology** 5(1): 83-92.
- GILL, L. S., 1992. **Ethnomedical uses of plants in Nigeria**. University of Benin Press, Benin City.
- GOYAL, P., N. JAIN, N. S. PANWAR, G. K. SINGH & B. P. NAGORI, 2013. Investigation of hypoglycemic and antidiabetic activities of ethanol extracts of *Kalanchoe pinnata* leaves in streptozocin-induced diabetic rats. **International Journal of Pharmacology and Toxicology** 3: 9-18.
- JUDD, W. S., C. S. CAMPBELL, E. A. KELLOGG, P. F. STEVENS & M. J. DONOGHUE, 2009. **Sistemática vegetal: um enfoque filogenético**: 3. ed. Artmed, Porto Alegre.
- KAMBOJ, A. & A. K. SALUJA, 2009. *Bryophyllum pinnatum* (Lam) Kurz: phytochemical and pharmacological profile: a review. **Pharmacognosy Reviews** 3(6): 364-374.
- KIRTIKAR, K. R. & B. D. BASU, 1975. **Indian medicinal plants**: 2: 1-999. Bishen Singh Mahendra Pal Singh, Dehradun.
- KLANCNIK, A., S. PISKERNIK, B. JERSEK & S. S. MOZINA, 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. **Journal of Microbiological Methods** 81(2): 121-126. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2010.02.004>.
- KUETE, V., 2010. Potential of Cameroonian plants and derived products against microbial infections: a review. **Planta Medica** 76(14): 1479-1491. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0030-1250027>.
- LANS, C. A., 2006. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** 2: 45. DOI: <https://doi.org/10.1186/1746-4269-2-45>.
- LIPSKY, B. A., 2007. Empirical therapy for diabetic foot infections: are there clinical clues to guide antibiotic selection? **Clinical Microbiology and Infection** 13(4): 351-353. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2007.01697.x>.
- LIU, W., J. LIU, D. YIN & X. ZHAO, 2015. Influence of ecological factors on the production of active substances in the anti-cancer plant *Sinopodophyllum hexandrum* (Royle) T.S. Ying. **PLoS One** 10(4): e0122981. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122981>.
- LUBER, P., E. BARTELT, E. GENSCHOW, J. WAGNER & H. HAHN, 2003. Comparison of broth microdilution, E Test, and agar dilution methods for antibiotic susceptibility testing of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. **Journal of Clinical Microbiology** 41(3): 1062-1068.
- MAHATA, S., S. MARU, S. SHUKLA, A. PANDEY, G. MUGESH, B. C. DAS, & A. C. BHARTI, 2012. Anticancer property of *Bryophyllum pinnata* (Lam.) Oken. leaf on human cervical cancer cells. **BMC Complementary and Alternative Medicine** 12: 15. DOI: <https://doi.org/10.1186/1472-6882-12-15>.
- MATTHEW, S., A. K. JAIN, C. MATTHEW, M. KUMAR & D. BHOWMIK, 2013a. Antidepressant activity of ethanolic extract of plant *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. in mice. **Indian Journal of Research in Pharmacy and Biotechnology** 1(2): 153-155.
- MATTHEW, S., D. SINGH, S. JAISWAL, M. K. B. JAYAKAR & D. BHOWMIK, 2013b. Antidiabetic activity of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. in alloxan induced diabetic rats. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research** 6(1): 1-7.





- MUZITANO, M. F., L. W. TINOCO, C. GUETTE, C. R. KAISER, B. ROSSIBERGMANN & S. S. COSTA, 2006. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Phytochemistry** 67(18): 2071-2077. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.027>.
- MUZITANO, M. F., C. A. B. FALCÃO, E. A. CRUZ, M. C. BERGONZI, A. R. BILIA, F. F. VINCIERI, B. ROSSI-BERGMANN & S. S. COSTA, 2009. Oral metabolism and efficacy of *Kalanchoe pinnata* flavonoids in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Planta Medica** 75(4): 307-311. DOI: <https://doi.org/10.1055/s-0028-1088382>.
- OFOKANSI, K. C., C. O. ESIMONE & C. R. ANELE, 2005. Evaluation of the in vitro combined antibacterialeffect of the leaf extracts of *Bryophyllum pinnatum* and *Ocimum gratissimum* (Labiatae). **Plant Products Research Journal** 9: 6-10. DOI: <https://dx.doi.org/10.4314/pprj.v9i1+35242>.
- OJEWOLE, J. A. O., 2002. Antihypertensive properties of *Bryophyllum pinnatum* {(Lam) Oken} leaf extracts. **American Journal of Hypertension** 15(S3): 34a. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0895-7061\(02\)02353-1](https://doi.org/10.1016/S0895-7061(02)02353-1).
- OKWU, D. E. & F. U. NNAMDI, 2011a. A novel antimicrobial phenanthrene alkaloid from *Bryopyllum pinnatum*. **Journal of Chemistry** 8(3): 1456-1461. DOI: <https://dx.doi.org/10.1155/2011/972359>.
- OKWU, D. E. & F. U. NNAMDI, 2011b. Two novel flavonoids from *Bryophyllum pinnatum* and their antimicrobial activity. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research** 3(2): 1-10.
- PAL, S. & A. K. NAG CHAUDHURI, 1991. Studies on the anti-ulcer activity of a *Bryophyllum pinnatum* leaf extract in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology** 33(1-2): 97-102.
- PALOMBO, E. A., 2011. Traditional medicinal plant extracts and natural products with activity against oral bacteria: potencial application in the prevention and treatment of oral diseases. **Evidence Based Complementary and Alternative Medicine** 2001: 680354. DOI: <https://dx.doi.org/10.1093/ecam/nep067>.
- PATHARE, N. A., A. BAL, G. V. TALVALKAR & D. U. ANTANI, 1998. Diabetic foot infections: a study of microorganisms associated with the different Wagner grades. **Indian Journal of Pathology & Microbiology** 41(4): 437-441.
- PERIM, M. C., J. C. BORGES, S. R. C. CELESTE, E. F. ORSOLIN, G. O. MENDES, R. R. MENDES, R. L. FERREIRA, S. C. CARREIRO, & M. C. S. PRANCHEVICIUS, 2015. Aerobic bacterial profile and antibiotic resistance in patients with diabetic foot infections. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** 48(5): 546-554. DOI: <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0146-2015>.
- QUAZI MAJAZ, A., S. NAZIM, Q. ASIR, Q. SHOEB & G. M. BILAL, 2011. Screening of in-vitro anthelmintic atcivity of *Kalanchoe pinnata* roots. **International Journal os Research in Ayurveda and Pharmacy** 2(1): 221-23.
- RAJSEKHAR, P.B., R. S. ARVINDBHARANI, M. RAMACHANDRAN, K. JINI ANGEL & S. P. V. RAJSEKHAR, 2016. The "wonder plant" *Kalanchoe pinnata* (Linn.) Pers.: a review. **Journal of Applied Pharmaceutical Science** 6(3): 151-158. DOI: <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60326>.
- RAMAKANT, P., A. K. VERMA, R. MISRA, K. N. PRASAD, G. CHAND, A. MISHRA, G. AGARWAL, A. AGARWAL & S. K. MISHRA, 2011. Changing microbiological profile of pathogenic bacteria in diabetic foot infections: time for a rethink on which empirical therapy to choose? **Diabetologia** 54(1): 58-64. DOI: <https://doi.org/10.1007/s00125-010-1893-7>.
- SALAMI, E. O., R. I. OZOLUA, S. O. OKPO, G. I. EZE & D. O. UWAYA, 2013. Studies on the anti- asthmatic and antitussive properties of aqueous leaf extract of *Bryophyllum pinnatum* in rodent species. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine** 6(6): 421-425. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(13\)60067-X](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(13)60067-X).
- SALAZAR-ARANDA, R., L. A. PÉREZ-LÓPEZ, J. LÓPEZ-ARROYO, B. A. ALANÍSGARZA & N. W. TORRES, 2009. Antimicrobial and antioxidant activities of plants from northeast of Mexico. **Evidence - Based Complementary and Alternative Medicine** 2001: 536139. DOI: <https://doi.org/10.1093/ecam/nep127>.
- SHARMA, A. L., M. A. BHOT & N. CHANDRA, 2014. Gastroprotective effect of aqueous extract and mucilage from *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz. **Ancient Science of Life** 33(4): 252-258. DOI: <https://doi.org/10.4103/0257-7941.147434>.
- SUPRATMAN, U., T. FUJITA, K. AKIYAMA, H. HAYASHI, A. MURAKAMI, H. SAKAI, K. KOSHIMIZU & H. OHIGASHI, 2001. Anti-tumour promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontiana* × *tubiflora*. **Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry** 65(4): 947-949. DOI: <https://doi.org/10.1271/bbb.65.947>.
- TATSIMO, S. J., D. TAMOKOU JDE, L. HAVYARIMANA, D. CSUPOR, P. FORGO, J. HOHMANN, J. R. KUIATE & P. TANE, 2012. Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. **BMC Research Notes** 5: 158. DOI: <https://doi.org/10.1186/1756-0500-5-158>.
- URBANCIC-ROVAN, V. & M. GUBINA, 2009. Bacteria in superficial diabetic foot ulcers. **Diabetic Medicine** 17(11): 814-815. DOI: <https://doi.org/10.1046/j.1464-5491.2000.00374-2.x>.
- WILLCOX, M. L. & G. BODEKER, 2004. Traditional herbal medicines for malaria. **British Medical Journal** 329(7475): 1156-1159. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.329.7475.1156>.
- YADAV, N. P. & V. K. DIXIT, 2003. Hepatoprotective activity of leaves of *Kalanchoe pinnata* Pers. **Journal of Ethnopharmacology** 86(2-3): 197-202.

