

Efeito antibacteriano e antifúngico de extratos etanólico, hexânico e metanólico a partir de folhas de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (Malva corama) contra cepas multi-resistentes a drogas

Paloma de Souza Santana^{1*}, Raul Sousa Andreza¹, Vivianne Inácio Leite¹, Priscila Caracas Vieira de Sousa², Amanda Aragão Alves², Saulo Relison Tintino³, Cícera Datiane Morais de Oliveira⁴, Fernando Gomes Figueredo⁵, Gabriel Gusmão Grisi Rocha⁷, Ana Luiza de Aguiar Rocha Martin⁷, Bruna Suellen Pereira⁸, Roberta Oliveira da Costa⁹, Francisco Adelvane de Paulo Rodrigues¹⁰, Livia Maria Garcia Leandro¹, Pedro Everson Alexandre de Aquino¹¹

1. Biomédico(a) (Faculdade Leão Sampaio, Brasil).

2. Bióloga, Mestranda em Farmacologia (Universidade Federal do Ceará, Brasil).

3. Biólogo (Universidade Regional do Cariri). Doutorando em Biotecnologia (Universidade Federal de Pernambuco, Brasil).

4. Bióloga, Mestranda em Bioprospecção Molecular (Universidade Regional do Cariri).

5. Biomédico (Faculdade Leão Sampaio). Mestrando em Bioprospecção Molecular (Universidade Regional do Cariri, Brasil).

6. Farmacêutico (Universidade Tiradentes). Mestrando em Farmacologia (Universidade Federal do Ceará, Brasil).

7. Farmacêutica, Mestranda em Farmacologia (Universidade Federal do Ceará, Brasil).

8. Graduada em Farmácia (Faculdade Estácio, Brasil).

9. Educadora Física (Faculdade Católica do Ceará). Mestranda em Ciências Morfofuncionais (Universidade Federal do Ceará, Brasil).

10. Educador Físico (Centro Universitário Estácio de Sá). Doutorando em Farmacologia (Universidade Federal do Ceará, Brasil).

11. Biomédico (Faculdade Leão Sampaio). Mestrando em Farmacologia (Universidade Federal do Ceará, Brasil).

* Autor para correspondência: palomasantana123@hotmail.com

RESUMO. As infecções causadas por bactérias e fungos, assim como a sucessiva resistência desses micro-organismos, continuam com altas incidências. Desse modo, estudos com plantas medicinais e sua combinação à terapia convencional, fazem-se essenciais. O presente estudo verificou a atividade antibacteriana, antifúngica e modificadora da resistência a antibióticos e antifúngicos dos extratos etanólico, hexânico e metanólico das folhas de *Kalanchoe pinnata*, utilizada na medicina popular. A fitoquímica foi realizada de forma qualitativa através de observação visual da mudança de coloração e formação de precipitados após adição de reagentes específicos como: cloreto férrico (FeCl₃10%) hidróxido de sódio (NaOH10%), ácido clorídrico (HCL 1%), ácido acético 5%, hidróxido de amônia (NH₄OH 10%), clorofórmio 10% e reagente de Draggendorff. A análise para a atividade antimicrobiana foi por meio do teste de microdiluição para determinação de concentração inibitória mínima (CIM) e modificadora da ação dos antibióticos (gentamicina e amicacina) e antifúngicos (cetoconazol e fluconazol) em associação com os extratos. Os ensaios fitoquímicos indicaram a presença de metabólitos secundários como flavonóides, alcalóides e taninos flavobênicos. Na avaliação da CIM foram obtidos resultados < 1024µg/mL para *Candida albicans* e *Candida krusei*. Houve sinergismo entre os extratos das folhas de *Kalanchoe pinnata* com os aminoglicosídeos e antifúngicos, reduzindo a concentração da CIM das cepas multirresistentes. Nossos resultados demonstram que os extratos da *Kalcinchoe pinnata* possuem constituintes bioativos com atividade antimicrobiana *in vitro*.

Palavras-chave: *Kalcinchoe pinnata*, microrganismos, efeito sinérgico, antifúngico, antibacteriano.

Antibacterial and antifungal effect of ethanol extracts, Hexane and methanolic from the leaves of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers (Malva corama) against multi-drug resistant strains

The infections caused by bacteria and fungi, as well as the subsequent resistance of these microorganisms continue with high incidences. This study examined the antibacterial, antifungal and modifier of resistance to antibiotics and antifungal extracts of ethanol, hexane and methanol from the leaves of *Kalanchoe pinnata*, used in folk medicine. The phytochemical was performed qualitatively by visual observation of color changes and formation of precipitates after addition of specific reagents, such as ferric chloride (FeCl₃10%) sodium hydroxide (NaOH10%), hydrochloric acid (HCl 1%), acetic acid 5%, ammonium hydroxide (NH₄OH 10%), chloroform and reagent Draggendorff 10%. The analysis for antimicrobial activity was through the microdilution test for determination of minimum inhibitory concentration (MIC) and modifying the action of antibiotics (gentamicin and amikacin) and antifungals (ketoconazole and fluconazole) in association with the extracts. The phytochemicals assays indicated the presence of secondary metabolites such as flavonoids, alkaloids and flavobénicos tannins. In assessing the MIC results were obtained < 1024µg/ mL for *Candida albicans* and *Candida krusei*. There was synergism between extracts of *Kalanchoe pinnata* leaves with aminoglycosides and antifungal, reducing the concentration of CIM of multidrug-resistant strains. Our results demonstrate that the extracts of *Kalanchoe pinnata* have bioactive constituents with antimicrobial activity *in vitro*.

Keywords: *Kalcinchoe pinnata*; microorganisms; synergistic effect; antifungal, antibacterial.

1. Introdução

O uso de vegetais como alternativa terapêutica é uma prática milenar e o potencial que os mesmos possuem estimula pesquisadores a um intenso estudo para promoção da saúde. O Brasil, por possuir um valioso conhecimento etnobotânico e uma ampla biodiversidade natural, tem recebido incentivos da Organização Mundial de Saúde para práticas em pesquisa científica sobre as plantas medicinais com finalidade terapêutica (HARAGUCHI; CARVALHO, 2010).

Nos últimos anos, houve um aumento na incidência de

infecções causadas por fungos e bactérias, assim como a sucessiva resistência destes micro-organismos aos antibióticos e antifúngicos. (AGUIAR et al., 2012; AHMED et al., 2012; SPELLBERG et al., 2013). Desse modo, tornou-se necessário pesquisar novas substâncias com novos alvos, a fim de combater esta resistência crescente (BARBOSA et al., 2014).

O uso inadequado de antifúngicos e antibióticos revela um aumento significativo a essa resistência e alerta a sociedade mundial aos cuidados à saúde (GOODMAN et al., 2010). Desta forma, o desenvolvimento de substâncias

que atuam inibindo a resistência microbiana ou o seu crescimento é essencial; os vegetais são uma escolha por possuírem metabólitos com múltiplas propriedades e têm contribuído em resultados significativo e eficiente em tratamentos terapêuticos (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006).

Kalanchoe pinnata, dita popularmente como malva corama, tem suas folhas utilizadas na forma empírica para o tratamento de inflamação, corrimento vaginal, infecção urinária e na região genital (OLIVEIRA et al., 2007).

Diante do exposto, o estudo teve como objetivo realizar uma triagem fitoquímica e testar *in vitro* os extratos etanólico, metanólico e hexânico das folhas de *Kalanchoe pinnata* quanto à sua atividade antibacteriana e antifúngica e como um agente modificador da resistência a antibióticos e antifúngicos das cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Klebsiella pneumoniae*, além dos fungos leveduriformes: *Candida albicans* e *Candida krusei*.

2. Material e Métodos

Tipo de estudo, Obtenção do material vegetal e identificação botânica

Trata-se de uma pesquisa experimental e de caráter quantitativo. A coleta do material vegetal foi proveniente do cultivo popular em um jardim de uma residência na cidade de Juazeiro do Norte-Ceará, Brasil, coletada no mês de Novembro de 2014. Foi gerada uma exsicata da planta e depositada no Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri (URCA), obtendo um o seguinte registro 5568.

Obtenção dos extratos

Os extratos foram preparados a partir de 500g das folhas, previamente triturados, acondicionados a uma lavagem em água corrente em seguida emergidas em hipoclorito a 3% e submetidos à extração exaustiva a frio com etanol, metanol e hexano por 48 h. Após esse período, o solvente foi destilado em um rotaevaporador obtendo assim o extrato bruto, em seguida utilizado para os testes fitoquímicos e microbiológicos.

Análise fitoquímica dos extratos etanólico, metanólico e hexânico

As análises químicas dos extratos foram realizadas no Laboratório de Microbiologia aplicada da Faculdade Leão Sampaio, foi submetido ao método de prospecção fitoquímica, proposto por Matos (1997) e revisado por Matos (2009), que consiste na determinação preliminar das classes de constituintes secundários. São testes baseados na observação visual da mudança de coloração e formação de precipitados após adição de reagentes específicos, como descrito a seguir.

Testes para identificação de fenóis e taninos

Inicialmente foram preparadas as soluções com

300mg dos extratos brutos, dissolvidos em solvente hidrofílico etanol a 30% de água, em seguida são separadas seis porções de 3 ml, numeradas de (1,2,3,4,5e 6).

No tubo 1 adicionou-se três gotas de solução alcoólica de FeCl₃ 10%. Os materiais foram homogeneizados e foram observadas variações quanto a cor e formação de precipitados. A solução foi comparada com um teste em branco, contendo apenas água e cloreto férrico, a interpretação dos resultados é dada da seguinte forma: quando for coloração variável de azul a vermelho é indicativo de fenóis; o precipitado escuro com tonalidade azul é a presença de taninos hidrolisáveis (pirogálicos) e verde é a presença de taninos flavobênicos (condensados ou catéquicos).

Teste para antocianinas, antocianidinas e flavonóides

Foram utilizados os tubos 2,3 e 4, sendo um deles acidificado com HCl 1% a pH 3,0, outro alcalinizado com NaOH 10% a pH 8,5 e o terceiro ao pH 11. Foram observadas mudanças de coloração do material.

Testes para leucoantocianidinas, catequinas e flavononas

Foram utilizados os tubos 5 e 6, sendo o primeiro acidificado por adição de HCL 1% ao pH de 1,0 a 3,0 e o segundo alcalinizado por NaOH 10% até PH 11. Os tubos foram aquecidos durante dois a três minutos, observando as modificações na coloração.

Testes para alcalóides

Inicialmente foram preparadas soluções dos extratos brutos diluídos em 300 mg de em 30 mL de ácido acético a 5%. As soluções foram aquecidas até modo de fervura por alguns minutos, sendo em seguida transferida para um funil de separação. Logo após foi alcalinizada com Hidróxido de amônia (NH₄OH 10%), aproximadamente 10 mL e verificado a variação de pH com auxílio do papel indicador. Foram adicionados até 15 mL de clorofórmio nas soluções, homogeneizou-se e foram deixados em repouso. Caso a presença de alcalóides é realizado a fase clorofórmica, onde foi utilizado gotas de HCl 1% e o reagente Dragendorff.

Atividade antibacteriana, antifúngica e determinação da concentração inibitória mínima

As bactérias e fungos fazem parte do banco de micro-organismos da Faculdade Leão Sampaio (FLS) e Universidade Regional do Cariri (URCA) que foram inoculadas em BHI (*Brain Heart InfusionBroth*) e *sabouraud* (HARLEY; PRESCOTT, 1996) e mantidas em estufa bacteriológica a 37°C/24h.

Os microrganismos utilizados foram: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosas*, *Klebsiella pneumoniae*, cepas padrões e multirresistentes. Além dos fungos leveduriformes: *Candida albicans* e *Candida krusei* (Tabela 1)

Tabela 1. Origem dos microrganismos e perfil de resistência aos antibióticos e antifúngicos. / **Table 1.** Origin of microorganisms and resistance profile to antibiotics and antifungals.

Microrganismos	Origem	Resistência aos antibióticos
<i>Staphylococcus aureus</i> 358	Ferida cirúrgica	Oxa, Gen, Tob, Ami, Ca, Neo, Para, But, Sis, Net
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	
.	Ferida cirúrgica	Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob
<i>Escherichia coli</i>	ATCC 10536	
<i>Escherichia coli</i> 27		Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> 03	Urocultura de paciente da UTI	Ast, Ax, Amp, Ami, Amox, Ca, Cfc, Cf, Caz, Cip, Clo, Im, Can, Szt, Tet, Tob
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 15442	
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 131	Ponta de cateter	Cpm, Ctz, Im, Cip, Ptz, Lev, Mer, Ami
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 19456	
<i>Candida albicans</i> 62	Hemoculturas	Var,Flu,Itra.
<i>Candida albicans</i>	ATCC 23679	
<i>Candida krusei</i> 02	Hemoculturas	Var,Flu,Itra,Cet.
<i>Candida Krusei</i>	ATCC 16789	

Ast-Azitromicina; Ax-Amoxicilina; Amp-Ampicilina; Ami-Amicacina; Amox-Amoxilina, Ca-Cefalexina; Cfc- cefaclor; Cf-Cefalotina; Caz-Ceftazidimida; Cip-Ciprofloxacino; Clo-Clorafenicol; Im-Imipenem; Can-Canamicina; Szt-Sulfametoxazol, Tet-Tetraciclina; Tob-Tobramicina; Oxa-Oxacilina; Gen-Gentamicina; Neo-Neomicina; Para-Paramomicina; But-Butirosine; Sis-Sisomicina; Net-Netilmicina; Var-Variconazol; Flu-Fluconazol; Itra-Itraconazol; Cet-Cetoconazol.

As atividades antibacteriana e antifúngica dos extratos foram avaliadas pela metodologia de microdiluição em caldo, com base no documento M7-A6 (CLSI/NCCLS 2008) para bactérias e fungos. Previamente, as cepas bacterianas e fúngicas foram ativadas em meios *Brain Heart Infusion Broth* (BHI) e *Sabouraud*, respectivamente, durante 24 h a 35 ± 2 °C. Após este pré-cultivo ocorreu à padronização do inóculo, que consistiu na preparação de uma suspensão bacteriana e fúngica em BHI e *Sabouraud* a 3,8%, com turvação correspondente a 0,5 da Escala McFarland (1×10^8 Unidades Formadoras de Colônias/mL). Em seguida essa suspensão foi diluída até 1×10^6 Unidades Formadoras de Colônias/ mL em caldo BHI a 10%, e volumes de 100 µL foram então homogeneizados em placa de microdiluição com 96 poços, acrescidos com diferentes concentrações dos extratos, resultando num inóculo final de 5×10^5 Unidades Formadoras de Colônias /mL (CLSI/NCCLS,2008).

Os extratos foram solubilizados inicialmente em água destilada estéril e dimetilsulfóxido (DMSO) de forma que foi obtido a solução estoque de 1024 µg/mL. Os testes foram efetuados em triplicata.

As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C durante 24 h. Para revelação dos resultados, foi preparada uma solução indicadora de resazurina sódica em água destilada na concentração de 0,01%. Após a incubação, 25 µL da solução indicadora foram adicionados em cada cavidade e as placas foram incubadas por 1 h em temperatura ambiente. O controle negativo do teste é realizado com o caldo BHI (SALVAT et al., 2001).

A concentração inibitória mínima (CIM) foi definida como a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano, nos poços de microdiluição conforme detectado a olho nu. A leitura dos resultados para determinação da CIM foi feito com resazurina considerada como positiva para os poços que permaneceram com a coloração azul e negativa os que

obtiveram coloração vermelha, para as bactérias e para os fungos foi avaliado a presença de turvação. (SALVAT et al., 2001).

Avaliação da atividade modificadora dos antibióticos e antifúngicos em associação com os extratos

A CIM de antibióticos da classe dos aminoglicosídeos (amicacina e gentamicina) e antifúngicos (cetoconazol e fluconazol), foi realizada na presença e na ausência dos extratos em microplacas estéreis. Os extratos foram testados em concentração subinibitória (CIM/8). Foram distribuídos 100µL da solução contendo BHI com o inóculo de micro-organismo e os extratos em cada poço. Após isso, foram misturados 100µL dos antibióticos/antifúngicos com a solução do primeiro poço, em seguida uma diluição de 1:2, variando as concentrações dos fármacos entre 2500 a 2,44g/mL. As placas foram incubadas a 35 ± 2 °C por 24 horas e após esse período a leitura foi evidenciada pelo uso de resazurina (para bactérias) como citado anteriormente no teste de determinação da CIM e para os fungos presença de turvação. Foi realizado um teste somente com os meios sem as bactérias e fungos, para verificação de contaminação (SAGDIÇ, 2005; GIBBONS, 2004; COUTINHO et al., 2009).

Análise estatística dos dados

Foi aplicada à análise de variância de duas vias seguido pelo teste de *Bonferroni* utilizando o software *GraphPadPrism* 6.0, para os testes de modulação com os antibióticos. Foram considerados relevantes valores com $P < 0,05$. Para os ensaios com os fungos os resultados foram expressos como média das repetições.

3. Resultados e Discussão

Na prospecção fitoquímica (Tabela 2) notou-se uma variedade de metabólitos como: taninos flavobênicos, flavonas, xantonas, chalconas, flavanois, flavanoides/fenóis,

leucoantocianidinas, catequinas, flavonas e alcalóides secundários que são responsáveis pelo desenvolvimento de diversas atividades biológicas dentre elas: antioxidante (BARREIROS et al. 2006), antimicrobiana (O'KENNEDY; THOMES 1997; DJIPA et al. 2000; ESQUENAZI et al. 2002), antitumoral e anti-ofídica (OKUDA et al., 1989).

Tabela 2. Prospecção fitoquímica dos extratos metanólico, hexânico e etanólico de *Kalcinchoe pinnata* L.(Malva Corama). / **Table 2.** Phytochemical Investigation of ethanol extracts, hexane of ethanol from *Kalcinchoe pinnata* L. (Malva Corama).

Constituintes Metabólicos	Extrato Metanólico	Extrato Hexânico	Extrato Etanólico
Taninos Flabobênicos	+	+	+
Flavonas e xantonas	+	+	+
Chalconas e Flavanois	+	+	+
Flavonoides / Fenóis	+	+	+
Leucoantocianidinas	+	+	+
Catequinas e flavonas	-	+	+
<u>Alcalóides</u>	+	+	+

Fonte: Dados da pesquisa.

Segundo Piddock, (2006) a ausência ou presença de certos constituintes químicos determinados na fitoquímica podem ser explicadas pela época ou horário da colheita, pelo manejo e acondicionamento da planta ou pela degradação dos constituintes por fatores ambientais

Tabela 3. Avaliação da Concentração inibitória mínima (µg/mL) dos extratos etanólico, metanólico e hexânico frente a bactérias e fungos padrões e multirresistentes. / **Table 3.** Evaluation of minimum inhibitory concentration (µg/ml) of ethanol extracts, methanol and hexane against bacteria and fungi patterns and multiresistant.

Microrganismos	Extrato Etanólico (µg/mL)		Extrato Metanólico (µg/mL)		Extrato Hexânico (µg/mL)	
	MR	P	MR	P	MR	P
<i>E.coli</i>	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
<i>S.aureus</i>	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	1024	≥ 1024	≥ 1024
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024	≥ 1024
<i>Candida albicans</i>	64	8	8	8	8	8
<i>Candida krusei</i>	512	64	512	128	256	256

Fonte: Dados da Pesquisa. MR- multirresistente, P- padrão.

O aumento do número de casos de resistência aos antibióticos é um problema reconhecido mundialmente como uma ameaça à saúde e a seleção de uma alternativa número de casos de resistência aos antibióticos é um problema reconhecido mundialmente como uma ameaça à saúde e a seleção de uma alternativa terapêutica é uma tarefa desafiadora e difícil para os pesquisadores (ROSSI;

Os metabólitos secundários são de grande importância clínica para a farmacologia, devido seus efeitos biológicos. Diversos produtos naturais derivados estão sendo utilizados como matéria prima para a formulação de novos compostos bioativos principalmente no tratamento de doenças infecciosas (BUTLER; BUSS, 2006).

Dentre os compostos apresentados, os flavonóides são substâncias aromáticas que apresentam diferentes classes como: flavonas, isoflavonas, antocianinas, que possuem atividades antitumorais, anti-inflamatória e antioxidante, além de ações antimicrobianas (FILHO et al., 2001; ARAÚJO, 2008).

Já os taninos são provenientes do metabolismo secundário das plantas e são definidos com polímeros fenólicos solúveis em água que precipitam proteínas e servem como um mecanismo de defesa natural contra as infecções microbianas. Catequinas, flavonas e leucoantocianidinas, possuem função antioxidante, anti-inflamatória, além de atividade antibacteriana e antifúngica (BATTESTIN et al., 2004).

A tabela 3 mostra os resultados da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos em contato com os micro-organismos. Houve somente redução da CIM dos fungos.

ANDREAZZI, 2005; JANA; DEB, 2006; COUTINHO et al., 2008; COUTINHO et al., 2009).

As Figuras 1, 2 e 3 representam os resultados dos extratos na avaliação da associação entre os extratos com a amicacina e gentamicina. Os resultados demonstraram que as combinações de todos os extratos apresentaram sinergismo frente a todas as linhagens testadas: P<0.001.

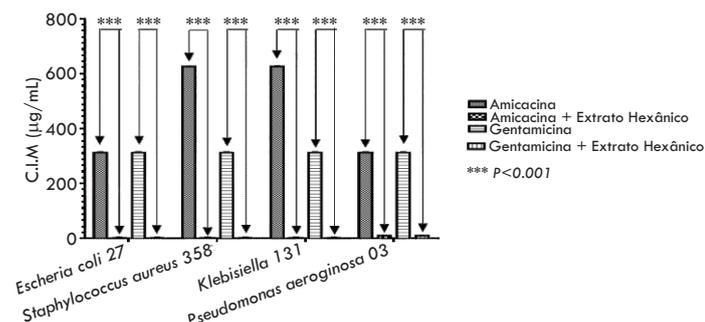


Figura 1. Concentração inibitória mínima (µg/mL) de aminoglicosídeos na ausência e presença do EHLK (Extrato Hexânico de *Kalcinchoe pinnata*). *** valor estatístico significativo P<0,001. / **Figure 1.** Minimum inhibitory concentration (µg/mL) of aminoglycosides in the absence and presence of EHLK (hexane extract of *Kalcinchoe pinnata*). *** Significant statistical value P <0.001.

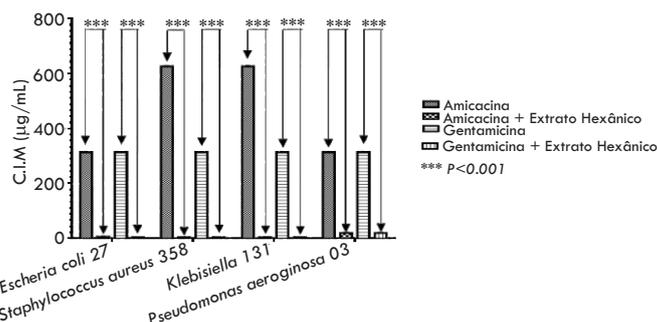


Figura 2. Concentração inibitória mínima (µg/mL) de aminoglicosídeos na ausência e presença do EHLK (Extrato Hexânico de *Kalcinchoe pinnata*). *** valor estatístico significativo P<0,001. / **Figure 2.** Minimum inhibitory concentration (µg/mL) of aminoglycosides in the absence and presence of EHLK (hexane extract of *Kalcinchoe pinnata*). *** Significant statistical value P <0.001.

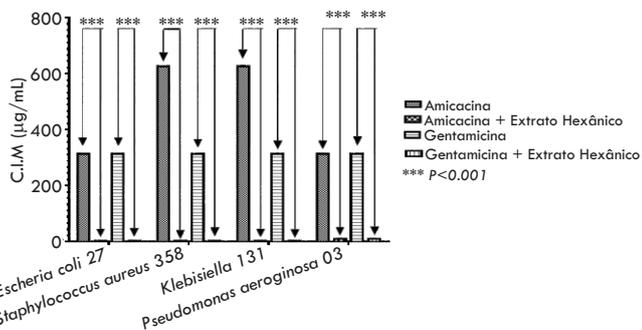


Figura 3. Concentração inibitória mínima (µg/mL) de aminoglicosídeos na ausência e presença do EHKL (Extrato Hexânico de *Kalanchoe pinnata*). *** valor estatístico significativo P<0,001. / **Figure 3.** Minimum inhibitory concentration (µg/mL) of aminoglycosides in the absence and presence of EHKL (hexane extract of *Kalanchoe pinnata*). *** Significant statistical value P<0.001.

Diversos produtos de origem natural como podem revertendo à resistência bacteriana eliminando plasmídios e inibindo a bomba de efluxo. Estudos do nosso grupo, com metodologia semelhante à de deste trabalho, também mostraram sinergismo como os realizados com as espécies *Momordica charantia*, *Cordia verbenaceae*, *Ocimum grartissimum* e *Sideroxylon obtusifolium*. Diversos metabólitos podem modificar a atividade de antibióticos, melhorando seu desempenho e diminuindo a sua dose terapêutica (COUTINHO et al., 2009; MATIAS et al., 2010; LEANDRO et al., 2013).

As ações produzidas pelos produtos naturais junto aos antimicrobianos utilizados nestes modelos podem alterar o efeito destes seja aumentando ou diminuindo a CIM (COUTINHO et al., 2008).

Combinações de extratos com os aminoglicosídeos pode ser uma alternativa viável, pois havendo sinergismo resultaria uma menor dose terapêutica e consequentemente minimizaria os efeitos colaterais provocados por essa classe de antibióticos (FIGUEREDO et al., 2013).

Na modulação com os antifúngicos também houve um sinergismo. Porém, melhor evidenciado para *Candida albicans 62* tanto para o cetoconazol, como o fluconazol, em associação com todos os extratos (Tabela 4).

Tabela 4. Determinação da concentração inibitória mínima (µg/mL) de antifúngicos na presença ou ausência dos extratos hexânico, metanólico e etanólico de *Kalanchoe pinnata* L. (Malva Corama). / **Table 4.** Determination of the minimum inhibitory concentration (µg/mL) of antifungal in the presence or absence of the hexane, methanolic and ethanolic extracts *Kalanchoe pinnata* L. (Malva Corama).

C. krusei 02	EMKL	EHKL	EEKL	CONTROLE
Cetoconazol (µg/mL)	625,0	625,0	625,0	625,0
Fluconazol (µg/mL)	312,50	1250,0	1250,0	2500,0
C. albicans 62	EMSO	EHSO	EEKL	CONTROLE
Cetoconazol (µg/mL)	2,44	2,44	2,44	156,25
Fluconazol (µg/mL)	2,44	2,44	2,44	312,50

Fonte: Dados da pesquisa. EMKL= extrato metanólico *Kalanchoe pinnata*. EHKL=extrato hexânico *Kalanchoe pinnata*. EEKL=extrato etanólico *Kalanchoe pinnata*

Estudos com fungos vêm ganhando destaque, pois os antifúngicos atuais apresentam toxicidade, dessa forma há um interesse na procura por novos antifúngicos efetivos e mais seguros (ZACCHINO, 2001).

Extratos de especiarias (orégano, cravo, canela e pimenta), óleos essenciais derivados da cebola, alho e outros vegetais tem demonstrado potencial para inibir o desenvolvimento de fungos (BENKEBLIA, 2004; SOUZA et

al., 2004; OLIVEIRA; BADIALE-FURLONG, 2008).

O estudo mostrou maior redução da CIM das cepas bacteriana multirresistentes se comparada as dos fungos. Segundo Morais-Braga et al., (2013), as bactérias apresentam maior susceptibilidade ao produto natural que os fungos, fundamentando assim a complexidade nas células eucarióticas do fungos e a dificuldade na pesquisa de um constituinte químico eficaz.

4. Conclusão

Os resultados desse trabalho demonstraram que *Kalanchoe pinnata* pode ser promissora no combate a resistência bacteriana e fúngica. Entretanto estudos futuros com os constituintes majoritários de cada extrato, são necessários para uma melhor elucidação dos mecanismos aqui observados.

Sendo assim este trabalho poderá contribuir como parâmetro para novos estudos demonstrando e valorizando o potencial bioativo e farmacológico das espécies vegetais provenientes da flora brasileira.

5. Referências Bibliográficas

AGUIAR, J. S.; ARAÚJO, R. O.; DESTERRO- RODRIGUES, M.; SENA, K. X.; BATISTA, A. M.; GUERRA, M. M.; OLIVEIRA, S. L.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; NASCIMENTO, S. C. Antimicrobial, Antiproliferative and Proapoptotic activities of extract, fractions and isolated compounds from the stem of *Erythroxylum caatingae* Plowman. **International Journal of Molecular Sciences**. v. 13, n. 4, p. 4124-4140, 2012.

AHMED, A. S.; ELGORASHI, E. E.; MOODLEY, N.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. The antimicrobial, antioxidative, antiinflammatory activity and cytotoxicity of different fractions of four South African *Bauhinia* species used traditionally to treat diarrhoea. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 143, n. 3, p. 826-839, 2012.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**.v.16, suplementar.p. 678-89, 2006.

ARAÚJO, J. M. **Química de Alimentos: Teoria e Prática**. 4. Ed. Viçosa: Editora UFV, 477p,2008.

BARBOSA FILHO, V. M.; WACZUK, E. P.; KAMDEM, J. P.; ABOLAJI, A. O.; LACERDA, S. R.; COSTA, J. G. M.; MENEZES, I. R. A.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; ROCHA, J. B. T.; POSSER, T. Phytochemical constituents, antioxidante activity, cytotoxicity and osmotic fragility effects of Caju (*Anacardium microcarpum*). **Industrial Cropsand Products**. v. 55, p. 280-288, 2014.

BARREIROS, A. L.B.S.; DAVID, J.M. Estresse Oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e a defesa do organismo. **Química Nova**. v. 29, n.1, p. 113-123, 2006.

BATTESTIN, V.; Matsuda, L.K.; Macedo, G.A. Fontes e aplicações de taninos e tanase em alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**. v.15, n.1, p.63-72, 2004.

BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Lebensm.-Wiss.u- Technol**. v. 37, p. 263-268, 2004.

BUTLER, M.S.; BUSS, A.D.; Natural products—the future scaffolds for novel antibiotics? **Biochemical Pharmacology**. v. 71, n. 7, p. 919-929, 2006.

COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; SIQUEIRA-JÚNIOR, J. P.; LIMA, E. O. *In vitro* anti-staphylococcal activity of *Hyptism artusii* Benth against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* - MRSA strains. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, suplementar, p. 670-675, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved Standard. NCCLS, Document M27-A3, 2008.

- DJIPA, C. D.; DELMEE, M.; QUENTIN-LECLERCQ, J. Antimicrobial Activity of bark extracts of *Syzygium jambos* (Myrtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. v. 71, p. 307-313, 2000.
- ESQUENAZI, D.; WIGG, M. D.; MIRANDA, M. M. F. S.; RODRIGUES, H. M.; TOSTES, J. B. F.; ROZENTAL, S.; DA SILVA A. J.; ALVIANO, C. S. Antimicrobial and antiviral activities of polyphenolics from *Cocos nucifera* Linn. (Palmae) husk fiber extract. **Research in Microbiology**. v. 53, p. 647-652, 2002.
- FIGUEREDO, F. G.; FERREIRA, E. O.; LUCENA, B. F. F.; TORRES, C. M. G.; LUCETTI, D. L.; LUCETTI, E. C. P.; SILVA, J. M. F. L.; SANTOS, F. A. V.; MEDEIROS, C. R.; OLIVEIRA, G. M. M.; COLARES, A. V.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A.; SILVA, J. C. F.; KERNTOPF, M. R.; FIGUEIREDO, P. R. L.; MATIAS, E. F. F. Modulation of the Antibiotic Activity by Extracts from *Amburana cearensis* A. C. Smith and *Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan. **BioMed Research International**. v. 1, p. 1-5. 2013.
- FILHO, D. W.; SILVA, E. L.; BOVERIS, A. Flavonóides antioxidantes de plantas medicinais e alimentos: importância e perspectivas terapêuticas. In: Yunes, R. A. e Calixto, J. B. Plantas Mediciniais: sob a ótica da química medicinal moderna. **Chapecó: Agros**. p. 317-334, 2001.
- GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Product Reports**. v. 21, p. 263-277, 2004.
- GOODMAN, L.; GILMAN, A. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11ª. Porto Alegre: Rio de Janeiro: Editora McGraw Hill. 2010.
- HARAGUCHI, L. M. M.; CARVALHO, O. B. D. **Plantas Mediciniais**. 1ª. São Paulo. 2010
- HARLEY, J. P.; PRESCOTT, L. M., **Laboratory exercises in microbiology**. 3ª ed. WCB publishers. 1996.
- JANA, S.; DEB, J. K. Molecular targets for design of novel inhibitors to circumvent aminoglycoside resistance. **Current Drug Targets**. v. 6, n. 3, p. 353-361, 2005.
- LEANDRO, L. M. G.; AQUINO, P. E. A.; MACEDO, R. O.; RODRIGUES, F. F. G.; GUEDES, T. T. M.; FRUTUOSO, A. D.; COUTINHO, H. D. M.; BRAGA, J. A.; RIBEIRO, T. R. G.; MATIAS, E. F. F. Avaliação antibacteriana e modulatória de extratos metanólicos e hexânicos da casca de *Sideroxylon obtusifolium*. **E-ciência**. v. 1, n. 1, 2013.
- MATIAS, F. F. E. **Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora da resistênciabacteriana a aminoglicosídeos de extratos polares e apolares de *Croton campestris* A.(velame), *Ocimum gartissimum* (alfavaca) e *Cordia verbanacea* DC.(erva-baleeira)**.Dissertação(mestrado)Programa de Pós-graduação em Bioprospecção molecular de produtos naturais e microbiologia.Universidade Regional do Cariri-URCA.Crato-CE.2010.
- MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 3ª ed. Fortaleza, Edições UFC, 2009.
- MATOS, F.J.A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2.ed. Fortaleza-CE. Editora:UFC,1997.
- O'KENNEDY, R.; THOMES, R. D. **Coumarins: biology applications and mode of action**, New York: John Willey, 1997.
- OKUDA, T.; YOSHIBA, T.; HATANO, T. Ellagitannins as active constituents of medicinal plants.**Planta Médica**. v. 55, p.117-122, 1989.
- OLIVEIRA, M. S; BADIALE-FURLONG, E. Screening of antifungal and antimycotoxigenic activity of plant phenolic extracts. **World Mycotoxin Journal**. v. 1, n. 2, 2008.
- OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; SOUZA, E. L.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SILVA-FILHO, R. N. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, p.186-90, 2007.
- ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. **Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma**. São Paulo: Atheneu, 2005.
- SAGDIÇ, O. Sensitivity of four pathogens pathogenic bacteria to *Turkish thyme* and *Oregano hydrossols*. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**. v. 36, p. 467-473, 2005.
- SALVAT, A.; ANTONNACCI, L.; FORTUNATO, R. H.; SUAREZ, E. Y.; GODOY, H. M. Screening of some plants from North Argentina for their antimicrobial activity. **Letters in Applied Microbiology**. v. 32, n. 5, p. 293-297, 2001.
- SOUZA, G. C.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G.L.; SCHAPOVAL, E.E.S., ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal Ethnopharmacology**. v. 90, p.135-143, 2004.
- SPELLBERG, B.; BARTLETT, J.; GILBERT, D.The future of antibiotics and resistance. **The New England journal of medicine**. v. 368, n. 4, p. 299-302, 2013.
- ZACCHINO, S. Estratégia para a descoberta de novos agentes antifúngicos. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. **Chapecó: Argos**. p. 435-479.2001.