



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO

Centro Biomédico

Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Thiago José de Souza Barboza

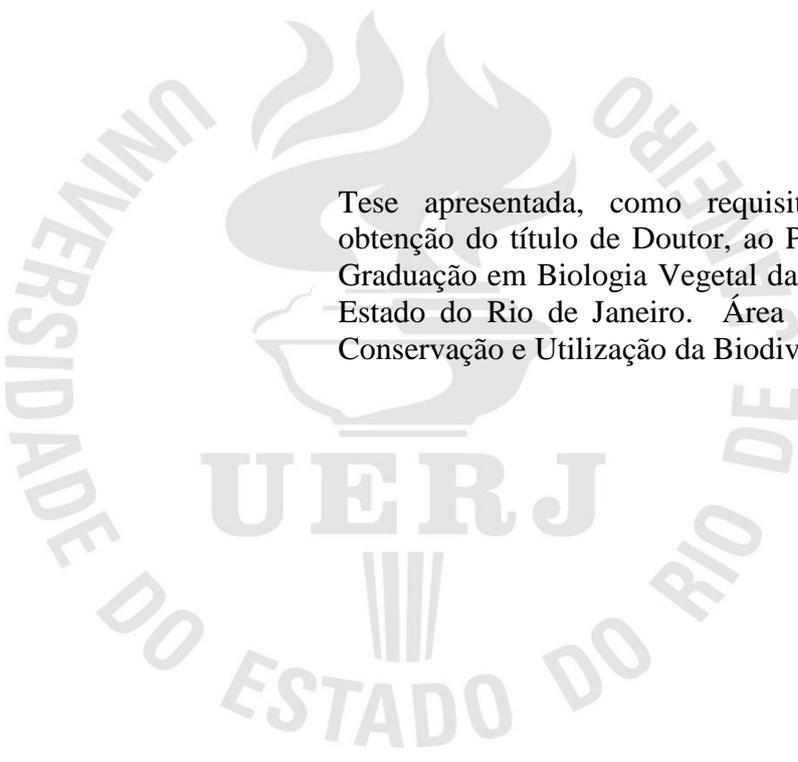
**Cultura de tecidos, aspectos fitoquímicos e avaliação dos potenciais
citotóxico, antibacteriano e antibiofilme de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.
cultivada *in vivo* e *in vitro***

Rio de Janeiro

2017

Thiago José de Souza Barboza

**Cultura de tecidos, aspectos fitoquímicos e avaliação dos potenciais citotóxico,
antibacteriano e antibiofilme de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. cultivada *in vivo* e *in
vitro***



Tese apresentada, como requisito parcial, para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Vegetal da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração:
Conservação e Utilização da Biodiversidade

Orientadora: Prof^a Dra. Norma Albarello

Coorientadora: Prof^a Dra. Ana Claudia de Paula Rosa Ignácio

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ / REDE SIRIUS / BIBLIOTECA CTC-A

B239 Barboza, Thiago José de Souza.
Cultura de tecidos, aspectos fitoquímicos e avaliação dos potenciais citotóxico, antibacteriano e antibiofilme de *Kalanchoe pinnata* (Lam) Pers. cultivada in vivo e in vitro. – 2017.
95 f. : il.

Orientadora: Norma Albarello
Coorientadora: Ana Claudia de Paula Rosa Ignácio
Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes.

1. Plantas medicinais - Teses. 2. Tecidos vegetais - Cultura e meios de cultura - Teses. 3. Fitoquímicos - Teses. . I. Albarello, Norma. II. Ignácio, Ana Claudia de Paula Rosa. III. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. IV. Título.

CDU 582.683.1

PatriciaBelloMeijinhos - CRB7/5217 - Responsável pela elaboração da ficha catalográfica

Autorizo, apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Thiago José de Souza Barboza

**Cultura de tecidos, aspectos fitoquímicos e avaliação dos potenciais
citotóxico, antibacteriano e antibiofilme de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. cultivada *in
vivo e in vitro***

Tese apresentada, como requisito parcial, para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-
Graduação em Biologia Vegetal da Universidade do
Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração:
Conservação e Utilização da Biodiversidade

Aprovada em 29 de junho de 2017

Orientadoras:

Prof.^a Dra. Norma Albarello (Orientadora)

Departamento de Biologia Vegetal - UERJ

Prof.^a Dra. Ana Cláudia de Paula Rosa Ignácio (Coorientadora)

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - UERJ

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Georgia Pacheco Peters de Almeida

Departamento de Biologia Celular - UERJ

Prof. Dr. Raphael Hirata Junior

Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia - UERJ

Prof. Dr. José Carlos Pelielo de Mattos

Laboratório de Radio e Fotobiologia - UERJ

Prof. Dr. Marco Eduardo do Nascimento Rocha

Instituto Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2017

AGRADECIMENTOS

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal da UERJ por possibilitar a realização deste trabalho.

À Professora Norma Albarello pelas oportunidades e apoio não só a este trabalho, mas nos oito anos de orientação na UERJ.

À professora Ana Claudia P. Rosa Ignácio pelo aprendizado e confiança em poder realizar os experimentos na área de microbiologia.

À equipe do Laboratório de Biotecnologia de Plantas (Labplan), do Núcleo de Biotecnologia Vegetal da UERJ.

À equipe da Disciplina de Microbiologia (DMIP – FCM/UERJ) pelo suporte e auxílio à metodologia em estudo.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biologia Vegetal e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela concessão de bolsa de doutorado.

RESUMO

BARBOZA, Thiago José de Souza. **Cultura de tecidos, aspectos fitoquímicos e avaliação dos potenciais citotóxico, antibacteriano e antibiofilme de *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. cultivada in vivo e in vitro.** 2017. 95f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017

A cultura de tecidos vegetais viabiliza a produção de biomassa vegetal e metabólitos secundários sob condições *in vitro*, em larga escala, reduzindo a necessidade de acesso ao material estabelecido *in vivo* e consequente risco de extinção a algumas espécies. *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers., conhecida popularmente como saião-roxo, é utilizada na medicina popular para tratamento de diversas enfermidades, tendo sido demonstrada também a atividade antibacteriana *in vitro* de extratos metanólicos e etanólicos da espécie. A produção e modulação de metabólitos de interesse antimicrobiano, como a quercetina, podem ser obtidas a partir da cultura de tecidos vegetais. Sendo assim, explantes foliares de *K. pinnata* foram inoculados em meio MS na presença das auxinas PIC, 2,4-D, ANA e AIB e das citocininas KIN, BAP e TDZ para morfogênese *in vitro*. Extratos aquosos e metanólicos de material *in vivo* e *in vitro* foram obtidos e avaliados quimicamente por método colorimétrico e cromatográfico. Para a avaliação da atividade citotóxica foram utilizadas as linhagens de carcinoma humano HEp-2, Caco-2 e T84, cultivadas na presença dos extratos aquosos e dos flavonoides quercetina e rutina. A atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de macrodiluição e a avaliação da atividade antibiofilme foi realizada em *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC 042). Foram obtidas plântulas *in vitro*, que posteriormente foram aclimatizadas com sucesso. Na presença de fitorreguladores foram obtidos calos, culturas de células em suspensão e raízes. A análise fitoquímica revelou a presença de fenóis, taninos, saponinas e 8 flavonoides nos diferentes extratos. Os extratos aquosos de *K. pinnata* não apresentam toxidez para HEp-2, porém sendo as demais cepas sensíveis a estes extratos. Ao contrário, os flavonoides quercetina e rutina não apresentaram citotoxicidade a nenhuma linhagem avaliada. A atividade antimicrobiana foi observada no extrato de folha obtida *in vivo*, rutina e quercetina, sendo esta última capaz de inibir o crescimento bacteriano. Apesar de não inibir o crescimento de EAEC 042, os extratos de *K. pinnata* foram capazes de reduzir o crescimento de biofilme até valores superiores a 50%. O cultivo com quercetina, foi capaz de inibir o crescimento de EAEC 042 e *Staphylococcus aureus* e reduzir a formação de biofilme simples e misto destas duas bactérias, demonstrando a atividade deste flavonoide, que pode ser considerado um dos princípios ativos na inibição do crescimento bacteriano. Sendo assim, conclui-se que *K. pinnata* possui grande potencial de cultivo *in vitro*, podendo ser explorado para a produção de metabólitos de interesse medicinal.

Palavras-chave: Crassulaceae. Citotoxicidade. Antibacteriano. Antibiofilme. Flavonoide. Cultura de tecidos vegetais.

ABSTRACT

BARBOZA, Thiago José de Souza. **Plant tissue culture, phytochemical aspects and evaluation of the cytotoxic, antibacterial and antibiofilm potentials of *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. grown *in vivo* and *in vitro***. 2017. 95f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017

The plant tissue culture provides the *in vitro* production of secondary metabolites and plant biomass on a large scale, reducing the need for access to the material growing *in vivo*. *Kalanchoe pinnata*, popularly known in Brazil as *saião-roxo*, is used in folk medicine to treat various diseases, has also been demonstrated *in vitro* antibacterial activity of methanol and ethanol extracts. The production of metabolites with antimicrobial interest, such as quercetin, may be obtained by plant tissue culture. Thus, leaf explants of *K. pinnata* were inoculated in MS medium in the presence of the auxins PIC, 2,4-D, NAA and IBA and the cytokinins KIN, BAP and TDZ for *in vitro* morphogenesis. The phytochemical evaluation was performed with colorimetric and chromatographic methods for aqueous and methanolic extracts of the material obtained *in vivo* and *in vitro*. To evaluate the cytotoxic activity were used the human carcinoma cell lines HEP-2, Caco-2 and T84, cultured in the presence of extracts and the flavonoids quercetin and rutin. The antibacterial activity was evaluated by the macrodilution method and the evaluation of antibiofilm activity was performed in Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC 042). *In vitro* plants were obtained and acclimatized successfully. In the presence of growth regulators were obtained calli, cell suspension cultures and roots cultures. Phytochemical analysis revealed the presence of phenols, tannins, saponins and 8 flavonoids in different extracts. The aqueous extracts of *K. pinnata* not show toxicity to Hep-2, but all other cells were sensitive to these extracts. Otherwise, the flavonoids quercetin and rutin showed no cytotoxicity at all the evaluated cell lines. The antimicrobial activity was observed in extract of leaves obtained *in vivo*, rutin and quercetin. Despite not inhibit the growth of EAEC 042, the extracts of *K. pinnata* was able to reduce the biofilm growth above 50%. The culture with quercetin was able to inhibit the growth of EAEC 042 and *Staphylococcus aureus* and to reduce the formation of simple and mixed biofilm of these two bacteria, showing that this flavonoid can be one of the active compounds in the inhibition of bacterial growth. In conclusion, *K. pinnata* have great potential for *in vitro* cultivation and can be exploited for the production of metabolites of medicinal interest.

Keywords: Crassulaceae. Cytotoxicity. Antibacterial. Antibiofilm. Flavonoid. Planttissueculture.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lam.) Pers. [Sin: <i>Bryophyllumpinnatum</i> (Lam.) Kurz.].....	16
Figura 2 -	Classificação taxonômica da família Crassulaceae.....	17
Figura 3 -	Plantas de <i>Kalanchoe pinnata</i> cultivadas em telado no PHLC/UERJ.....	23
Figura 4 -	Regeneração <i>in vitro</i> de <i>Kalanchoe pinnata</i> a partir de explantes foliares contendo gema na presença de diferentes fontes de carbono em meio MS sem fitorreguladores, após 60 dias de cultivo.....	36
Figura 5 -	Plantas de <i>Kalanchoe pinnata</i> regeneradas <i>in vitro</i> em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose após 30 dias de cultivo.....	37
Figura 6 -	Aclimatização de <i>Kalanchoe pinnata</i> após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> em meio MS com 90 mM de sacarose.....	37
Figura 7 -	Respostas morfogênicas de explantes foliares de <i>Kalanchoe pinnata</i> cultivados em meio MS sólido com 5 μ M de diferentes auxinas, após 60 dias de cultivo.....	40
Figura 8 -	Respostas morfogênicas de explantes foliares de <i>Kalanchoe pinnata</i> cultivados em meio MS sólido com 5 μ M de diferentes citocininas, após 60 dias de cultivo.....	41
Figura 9 -	Respostas morfogênicas de explantes excisados de plantas <i>in vitro</i> de <i>Kalanchoe pinnata</i> na de diferentes auxinas, após 60 dias de cultivo.....	44
Figura 10 -	Respostas morfogênicas de explantes foliares excisados de plantas <i>in vitro</i> de <i>Kalanchoe pinnata</i> em relação à presença de diferentes citocininas, após 60 dias de cultivo em meio líquido.....	45
Figura 11 -	Cromatograma de análise de flavonoides em extratos de <i>Kalanchoe pinnata</i> pelo método de CLAE-UV-DAD a 340 nm.....	47
Figura 12 -	Citotoxicidade de extratos aquosos (H ₂ O), metanólicos (MeOH) e de substâncias ocorrentes em <i>Kalanchoe pinnata</i> após 24 horas de cultivo a 37°C e 5% CO ₂	50
Figura 13 -	Atividade antibacteriana de extrato aquoso de folhas de <i>Kalanchoe pinnata</i> e do flavonoidequercetina após 24h de cultivo a 37°C.....	53
Figura 14 -	Formação de biofilmes de EAEC (042) após 18h de cultivo a 37°C na presença de extratos aquosos, metanólicos e substânciasocorrentes em <i>Kalanchoe pinnata</i> (μ g.mL ⁻¹) cultivada <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	55
Figura 15 -	Avaliação do potencial antibiofilme da quercetina (μ g.mL ⁻¹) sobre EAEC 042 e <i>S. aureus</i> cultivados isoladamente ou em mistura.....	56
Quadro 1 -	Cepas utilizadas nos ensaios para avaliação do potencial antibacteriano de <i>Kalanchoe pinnata</i>	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> de extratos de <i>Kalanchoe pinnata</i>	18
Tabela 2 -	Respostas morfogênicas de explantes foliares de <i>Kalanchoe pinnata</i> após 60 dias de cultivo <i>in vitro</i> , em meio MS sólido acrescido de diferentes fitorreguladores na concentração de 5 μ M.....	39
Tabela 3 -	Respostas morfogênicas em meio MS líquido a partir de explantes de <i>Kalanchoe pinnata</i> cultivados por 60 dias na presença de 5 μ M de fitorreguladores.....	43
Tabela 4 -	Análise do perfil fitoquímico de extratos metanólicos e aquosos de diferentes materiais de <i>K. pinnata</i> obtidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	46
Tabela 5 -	Análise de massas (m/z) para picos em tempos de retenção em comum obtidos por CLAE-UV-IES-EM a 240 nm para diferentes extratos de <i>Kalanchoe pinnata</i> cultivada <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	48
Tabela 6 -	Crescimento bacteriano na presença dos flavonoides quercetina e rutina e de extratos aquosos e metanólicos (μ g.mL ⁻¹) de <i>Kalanchoe pinnata</i> obtida <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>	52

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	11
1	CULTIVO <i>IN VITRO</i> E AVALIAÇÃO MEDICINAL DE PLANTAS.....	13
1.1	Produção de metabólitos especiais <i>in vitro</i>.....	13
1.2	<i>Kalanchoe pinnata</i> (Lamarck) Persoon.....	15
1.2.1	<u>Estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>K. pinnata</i>.....</u>	17
1.3	Relevância do estudo do potencial antibacteriano com espécies vegetais.....	20
2	OBJETIVOS.....	22
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	23
3.1	Material botânico.....	23
3.2	Cultura de tecidos de <i>K. pinnata</i>.....	24
3.2.1	<u>Estabelecimento <i>in vitro</i> de <i>K. pinnata</i>.....</u>	24
3.2.2	<u>Uso de diferentes fontes de carbono na regeneração <i>in vitro</i> de <i>K. pinnata</i>.....</u>	24
3.2.3	<u>Uso de fitorreguladores na resposta morfogênica <i>in vitro</i> de <i>K. pinnata</i>.....</u>	25
3.2.4	<u>Avaliação da morfogênese em explantes obtidos <i>in vitro</i>.....</u>	25
3.3	Análise fitoquímica.....	25
3.3.1	<u>Preparo de extratos e substâncias ocorrentes em <i>K. pinnata</i>.....</u>	25
3.3.2	<u>Ensaio fitoquímico indicativo das classes de metabólitos.....</u>	26
3.3.3	<u>Análise de flavonoides livres e ligados a açúcares.....</u>	28
3.4	Avaliação da citotoxicidade de extratos de <i>K. pinnata</i>.....	29
3.4.1	<u>Linhagens celulares.....</u>	29
3.4.2	<u>Cultivo e manutenção celular.....</u>	29
3.4.3	<u>Bioensaio de citotoxicidade com extratos e flavonoides ocorrentes em <i>Kalanchoe pinnata</i> obtidos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i>.....</u>	30
3.5	Avaliação do potencial antibacteriano de <i>K. pinnata</i>.....	30
3.5.1	<u>Isolamento de cepas.....</u>	30
3.5.2	<u>Ensaio de microdiluição.....</u>	31

3.5.3	<u>Avaliação do potencial de inibição na formação de biofilmes de EAEC 042.....</u>	32
3.5.4	<u>Avaliação do potencial antibiofilme da quercetina sobre biofilmes individuais e misto.....</u>	33
3.6	Análise estatística.....	34
4	RESULTADOS.....	35
4.1	Cultura de tecidos de <i>K. pinnata</i>.....	35
4.1.1	<u>Influência da fonte de carbono na regeneração <i>in vitro</i>.....</u>	35
4.1.2	<u>Uso de fitorreguladores na resposta morfogênica <i>in vitro</i> de <i>K. pinnata</i>.....</u>	38
4.1.3	<u>Avaliação da morfogênese em explantes obtidos <i>in vitro</i>.....</u>	41
4.2	Análise fitoquímica.....	45
4.3	Citotoxicidade de extratos de <i>K. pinnata</i>.....	48
4.4	Avaliação do potencial antibacteriano.....	51
4.5	Atividade do potencial antibiofilme.....	54
5	DISCUSSÃO.....	57
	CONCLUSÕES.....	67
	REFERÊNCIAS	69
	APÊNDICE- Artigo publicado	79

INTRODUÇÃO

As plantas estão relacionadas ao desenvolvimento humano há milhares de anos. São a base da medicina tradicional, sendo rica fonte de constituintes fitoquímicos que estão na composição de muitos fármacos. O uso de plantas medicinais é diverso em diferentes culturas no mundo todo. No Brasil, o modo de consumo predominante em comunidades tradicionais é na forma de chás, utilizando principalmente folhas e flores. Contudo, existem variadas formas de uso de espécies com propriedades medicinais, considerando, inclusive, a diversidade vegetal da nossa flora. A título de exemplo, só na região do pantanal podem ser encontradas mais de 19 famílias botânicas relacionadas ao uso medicinal por comunidades tradicionais. (PINTO et al., 2017).

A atividade medicinal de plantas é atribuída à ação de substâncias provenientes do metabolismo secundário vegetal. O metabolismo secundário difere do metabolismo primário por não produzir compostos orgânicos diretamente relacionados ao crescimento e desenvolvimento vegetal. No entanto, os metabólitos secundários, apesar de não vitais para os vegetais, apresentam importantes funções, como proteção contra infecções, atração de polinizadores e dispersores e na interação alelopática entre plantas. (OLIVOTO et al 2017).

Dentre as substâncias de interesse medicinal, destacam-se as das classes de alcaloides, glicosídeos, antraquinonas, saponinas, terpenos e polifenóis, como flavonoides e taninos (SHAKYA, 2016). Os metabólitos secundários ou especiais são substâncias de ocorrência restrita em grupos taxonômicos, podendo ser considerados marcadores químicos para diferentes táxons. Tais substâncias podem ser amplamente obtidas por diferentes sistemas *in vitro* (SILVA et al 2017).

O extrativismo não planejado de plantas para uso medicinal pode elevar o risco de extinção de algumas espécies. Este risco aumenta, principalmente, quando a coleta compromete o vegetal como um todo, como no caso do uso de raízes ou de herbáceas inteiras, que inviabilizam a persistência da espécie no local de coleta. Para contornar estas situações, técnicas de biotecnologia vegetal, como a cultura de tecidos vegetais, surge como uma ferramenta para a produção de material vegetal e metabólitos secundários *in vitro* em larga escala, favorecendo a redução da necessidade de acesso ao material estabelecido *in situ* (DELICHEH et al., 2014).

Mesmo considerando-se que estão em condições artificiais, as necessidades de plantas cultivadas *in vitro* são as mesmas daquelas estabelecidas no ambiente natural. Enquanto as plantas que encontram-se no seu ambiente natural suprem sua demanda energética pela fotossíntese, a partir da fixação de carbono proveniente do CO₂ atmosférico, sob condições *in*

vitro esse carbono é fornecido em grande parte por meio da adição de açúcares no meio de cultura. Nesse sentido, a composição do meio de cultura é específica para cada espécie, sendo o ponto chave para o estabelecimento e sucesso do cultivo de células e tecidos vegetais (MOLNÁR et al., 2011).

1 CULTIVO *IN VITRO* E AVALIAÇÃO MEDICINAL DE PLANTAS

1.1 Produção de metabólitos especiais *in vitro*

Diversas formulações de sais e vitaminas para meios de cultura vêm sendo desenvolvidas com vistas a suprir demandas específicas de cultivares. No entanto, existem formulações amplamente empregadas para diversas espécies, destacando-se a que foi proposta pelos pesquisadores Toshio Murashige e Folke K. Skoog (MURASHIGE; SKOOG, 1962), denominada meio MS. A partir de estudos com o cultivo de calos de folhas de tabaco, o meio MS foi elaborado por estes pesquisadores, se tornando hoje o meio de cultivo *in vitro* mais utilizado em culturas de tecidos vegetais.

Um dos principais fatores de indução da resposta morfo genética/morfogênica *in vitro* são os reguladores de crescimento vegetal ou fitorreguladores. São substâncias de baixo peso molecular que mimetizam a ação de hormônios vegetais naturais, denominados de fitormônios. As principais classes de fitorreguladores utilizadas em culturas de tecidos vegetais são as auxinas e citocininas. Dentre as auxinas comumente utilizadas *in vitro*, podemos destacar o ácido naftalenoacético (ANA), ácido indolilbutírico (AIB), ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) e ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (picloram - PIC). Entre as substâncias que possuem ação citocinínica mais usadas podemos destacar a 6-furfurilamino-purina (cinetina - KIN), a 6-benzilaminopurina (BAP) e a feniluréia com ação citocinínica (mas também auxínica em alguns casos) 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)-uréia (tidiazuron – TDZ) (CALDAS, 1998).

Ao contrário dos hormônios animais, que possuem atividade específica, os reguladores de crescimento vegetal possuem uma baixa diversidade estrutural e regulam muitos processos fisiológicos e morfogênicos de forma isolada ou sinergisticamente. A ação de um fitorregulador pode variar de acordo com a concentração, estágio de desenvolvimento vegetal, presença de outras substâncias ou fatores físicos, podendo inclusive apresentar ações antagônicas (ZABALAK et al., 2012).

Os efeitos biológicos são muitas vezes típicos de determinada classe hormonal. Os fitorreguladores do grupo das auxinas são frequentemente utilizados *in vitro* para o estímulo ao desenvolvimento de raízes adventícias. Já o grupo das citocininas é amplamente empregado para a produção de brotos, necessitando posteriormente de uma etapa de enraizamento para o estabelecimento de plantas inteiras. A combinação entre estas duas classes de reguladores pode estimular o desenvolvimento de calos, que são massas celulares que se proliferam de forma desorganizada, num processo denominado calogênese (ULLAH et al., 2014). Tanto as culturas organizadas, formadas por plantas ou órgãos isolados, quanto as culturas desorganizadas,

exemplificadas por calos e suspensões celulares, são fontes de produção *in vitro* de metabólitos secundários. Dentre os sistemas usados para a produção *in vitro* de metabólitos secundários, destacam-se as culturas organizadas, como as que envolvem técnicas de micropropagação e a cultura de raízes adventícias, ou ainda as culturas de tecidos desorganizados anteriormente mencionadas (FILOVÁ, 2014).

Existem três vias primárias de morfogênese *in vitro* para a regeneração de plantas a partir do desenvolvimento de explantes, que são pequenos segmentos vegetais retirados de uma planta para dar início a uma cultura. Estas vias são: a embriogênese somática, gerando embriões competentes à regeneração, a organogênese de broto e desenvolvimento de gemas pré-existentes, seguida por organogênese de raízes para o estabelecimento vegetal. Ambas podem ser obtidas de forma direta, quando os embriões ou brotos se formam diretamente a partir do explante, ou por forma indireta. Nesta última, há a produção de calos a partir do explante inicial, havendo a formação dos embriões e brotos a partir destes calos previamente formados (Phillips, 2004). Tais respostas constituem a técnica de micropropagação.

A micropropagação é então reconhecida como a técnica que viabiliza a propagação clonal massiva *in vitro* a partir de explantes cultivados em meio de cultura específico. Por meio desta técnica, a biomassa vegetal pode ser elevada em um curto período de tempo para a extração de metabólitos de interesse, além da possibilidade da modulação e otimização desta produção (GEORGE; DEBERGH, 2008).

Outro sistema de interesse no campo das medicinais é a cultura de raízes adventícias. A produção de raízes *in vitro* pode ser obtida a partir do cultivo de explantes radiculares ou pela indução de outros explantes, como foliares e caulinares. A rizogênese vai depender do estímulo fornecido por diferentes fitorreguladores e o balanço hormonal (KERBAUY, 1998). Devido ao contato direto com o solo na maioria dos vegetais, evolutivamente as raízes produzem substâncias para defesa contra a herbivoria e infecções (PARKER et al., 2012). Além da importância na fixação ao solo e absorção de nutrientes, estes órgãos podem produzir diversos metabólitos específicos nos vegetais, como é o caso da escopolamina, alcaloide tropânico de ação anticolinérgica e antiespasmódica, sintetizado em raízes de *Brugmasiacandida*. A escala de produção deste metabólito pode ser aumentada a partir do cultivo *in vitro* de raízes transformadas da espécie em biorreatores (OTÁLVARO-ÁLVAREZ; VELÁSQUEZ-LOZANO, 2014), o que tem sido observado também para outras espécies, como em *Atropa beladonna* (HABIBI et al., 2014).

O estímulo de fitorreguladores *in vitro* pode induzir a desdiferenciação de células dos explantes e proliferação destas, formando massas celulares calogênicas. Estas massas podem

representar um sistema altamente produtivo de metabólitos especiais *in vitro* (CID, 1998). A partir da dissociação destas células no cultivo em meio líquido, são obtidas culturas de células em suspensão, que têm como principal característica a alta taxa de multiplicação. Este material pode ser utilizado em escala comercial para a produção de metabólitos secundários de interesse farmacêutico, sendo desenvolvidos protocolos para produção em larga escala de diversas espécies (YUE et al., 2014).

1.2 *Kalanchoe pinnata*(Lamarck) Persoon

Membro da família Crassulaceae, a espécie *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon é uma planta suculenta de porte herbáceo, medindo de 50 a 100 cm de comprimento (Figura 1a). Apresenta caule de coloração marrom e folhas elípticas verde-amareladas, com filotaxia oposta e bordo foliar crenado, podendo este apresentar coloração rosada. Caracteristicamente apresenta reentrâncias no bordo foliar apresentando gemas foliares (Figura 1b) que respondem pela propagação vegetativa da espécie (Figura 1c) (WHO, 2009). Apresenta inflorescência do tipo paniculada, com flores pendentes em forma de sinos, de coloração amarelada e corola avermelhada (Figura 1d). O período de floração ocorre entre os meses de novembro e março, possuindo formação de frutos em abril (RAJ et al., 2014).

Conhecida popularmente no Brasil como saião-roxo, folha da fortuna ou saião, *K. pinnata* é cultivada em hortas e canteiros, devido ao seu uso medicinal e ornamental (OLIVEIRA et al., 2003). O nome “folha da fortuna” faz menção ao potencial das folhas da espécie em gerar vários propágulos, a partir de suas gemas, produzindo vegetativamente novos indivíduos. Apesar de possuir sementes viáveis, em condições de estresse a espécie pode superexpressar genes relacionados à embriogênese somática e formação de meristemas apicais, atuando no desenvolvimento das gemas em conversão de plantas completas (GARCÊS et al., 2007).

A espécie ocorre comumente em áreas quentes e secas, frequentemente em solos rochosos com pouca água. Distribui-se amplamente em várias regiões da África e Ásia, sendo cultivada também em jardins e residências como espécie ornamental e medicinal (WHO, 2009). À espécie têm sido atribuídas as atividades medicinais antibacteriana, antiparasitária, citotóxica, antimutagênica, antiviral, entre outras (RAJ et al., 2014).

Figura 1 - *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. [Sin: *Bryophyllumpinnatum* (Lam.) Kurz.].



(a)

(b)



(c)

(d)

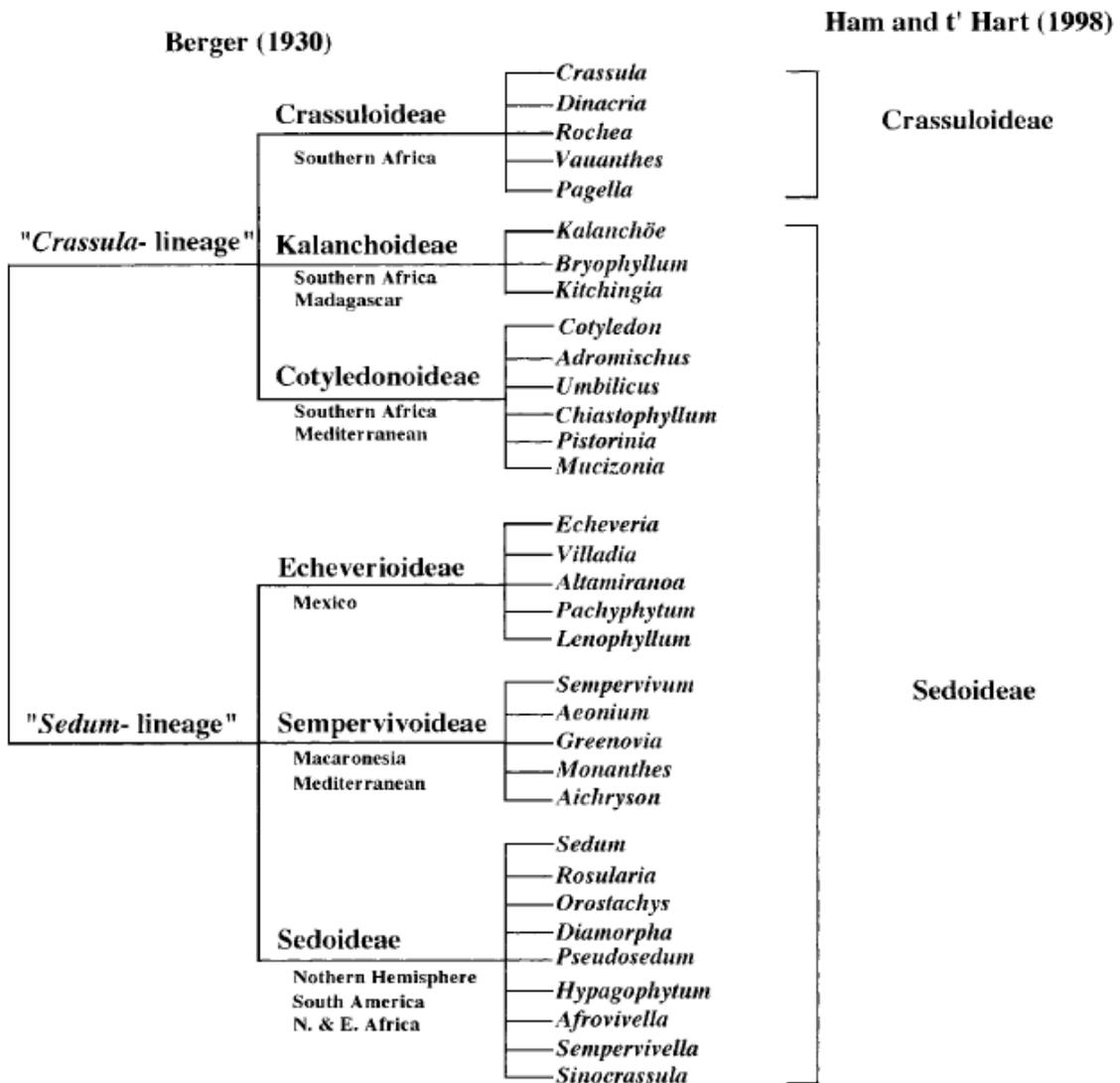
Legenda: (a) -*Habitus* herbáceo; (b) - Detalhe da folha enfatizando o bordo foliar crenado; (c) - Propágulo oriundo de gema localizada nas reentrâncias do bordo foliar; (d)- Inflorescência do tipo frouxa, pedicelada.
 Fonte: Imagens de internet obtidas de Google Imagens. <http://www.worldofsucculents.com>. Acesso em 10.12.2016.

Do ponto de vista taxonômico, *K. pinnata* apresenta a sinonímia botânica *Bryophyllumpinnatum* (Lam.) Kurz. Muitos problemas de classificação botânica são encontrados na subfamília Kalanchoideae, sendo propostas diversas organizações para alguns gêneros. Aos gêneros *Kalanchoe*, *Bryophyllum* e *Kitchiningia* é proposto que se tornem divisões de apenas um gênero, *Kalanchoe* (CHERNETSKYY, 2011).

A família Crassulaceae mostra-se sistematicamente complexa e morfológicamente diversa, devido em parte à grande adaptação recorrente ao ambiente árido a que estão submetidos seus representantes. Com distribuição mundial nestes ambientes, é consideradacosmopolita, possuindo centros de diversidade no México, África do Sul, Macaronésia e Himalaia (MORT et al., 2001). O estudo filogenético mais representativo da família Crassulaceae foi realizado por Berger (1930), reconhecendo 35 gêneros em seis subfamílias (Figura 2), sendo a subfamíliaKalanchoideae representada pelos gêneros

Kalanchoe, *Bryophyllum* e *Kitchiningia*. Atualmente, baseados em estudos de análise filogenética a partir de cpDNA (DNA de cloroplastos), Ham e t'Hart (1998) demonstraram a presença de muitos grupos polifiléticos nas subfamílias propostas por Berger. Deste modo, foi proposta a reorganização de Crassulaceae nas subfamílias Crassuloideae e Sedoideae (Figura 2), sendo o gênero *Kalanchoe* e suas três seções pertencentes à Sedoideae.

Figura 2 – Classificação taxonômica da família Crassulaceae, proposta por Berger (1930) e reorganizada por Ham & t'Hart (1998).



Fonte: Mortet et al., 2001.

1.2.1 Atividade antibacteriana de *K. pinnata*

Muitos estudos vêm sendo realizados avaliando a atividade antibacteriana de extratos e substâncias isoladas de *K. pinnata*. Uma breve revisão da atividade antibacteriana *in vitro* de extratos da espécie é apresentada na Tabela 1.

Extratos de folhas da espécie são amplamente utilizados nas formas aquosas, metanólica e etanólica, apresentando atividade contra diversas cepas tanto gram-positivas quanto negativas. Caules e raízes da espécie também têm sido avaliados em suas formas metanólicas e aquosas, obtendo resultados positivos para tal atividade.

Tabela 1 – Atividade antibacteriana *in vitro* de extratos de *Kalanchoe pinnata*.

Cepa testada	Material botânico	Tipo de extrato	Referência bibliográfica
<i>Alcaligenesfaecalis</i>	Folhas	Aquoso	Sharmaet al., 2014
	Caules, Raízes	Aquoso, Metanólico	
<i>Aspergillusniger</i>	Folhas, Caules, Raízes	Etanólico	Okwu;Nnamdi, 2011a,b
<i>Bacillusubtilis</i>	Folhas	Metanólico, Metanol 60%, Etanólico	Akinpelu, 2000; Aibinuet al., 2007; Biswas et al., 2011
	Folhas, Caules, Raízes	Aquoso, Metanólico	Sharmaet al., 2014
	Caules	Aquoso, Metanólico	Nwadinigwe, 2011
<i>Bordetellabronchiseptica</i>	Caules, Raízes	Aquoso, Metanólico	Sharmaet al., 2014
<i>Citrobactersp.</i>	Folhas	Metanólico	Aibinuet al., 2007
<i>Corynebacteriumdiphtheriae</i>	Caules, Raízes	Aquoso, Metanólico	Sharmaet al., 2014
<i>Enterococcusfaecalis</i>	Folhas	Metanólico	Aibinuet al., 2007
<i>Escherichia coli</i>	Folhas	Metanólico, Metanol 60%, Etanólico	Akinpelu, 2000; Aibinuet al., 2007; Biswas et al.,2011; Okwu; Nnamdi, 2011a,b; Pattewart al., 2013
<i>Klebsiellapneumoniae</i>	Folhas	Metanólico, Etanólico	Aibinuet al., 2007; Okwu&Nnamdi, 2011a,b
<i>Micrococcusluteus</i>	Caules, Raízes	Metanólico	Sharmaet al., 2014
<i>Propionibacteriumacnes</i>	Folhas	Aquoso	Kumaret al., 2013
<i>Proteusvulgaris</i>	Folhas	Metanol 60%	Akinpelu, 2000
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Folhas	Metanólico, Metanol 60%, Etanólico	Aibinuet al., 2007; Biswas et al., 2011; Okwu; Nnamdi, 2011a,b; Pattewart al., 2013
	Planta inteira	Metanólico, Etanólico, Hexânico	Tatsimoet al., 2012

<i>Salmonella paratyphi</i>	Folhas	Metanólico	Aibinuet al., 2007
<i>Salmonella typhi</i>	Planta inteira	Metanólico, Etanólico, Hexânico	Tatsimoet al., 2012
	Caules	Aquoso	Nwadinigwe, 2011
<i>Serratiamarcescens</i>	Caules	Aquoso	Sharmaet al., 2014
	Raízes	Metanólico	
<i>Shigelladysenteriae</i>	Folhas	Metanol 60%, Etanólico	Akinpelu, 2000; Biswaset al., 2011
<i>Shigella flexneri</i>	Folhas	Metanólico	Aibinuet al., 2007
<i>Staphylococcus aureus</i>	Folhas	Metanólico, Metanol 60%, Etanólico	Akinpelu, 2000; Aibinuet al., 2007; Biswas et al., 2011; Okwu; Nnamdi, 2011a,b; Pattewart al., 2013
	Caule	Metanólico	Nwadinigwe, 2011
	Planta inteira	Metanólico, Etanólico, Hexânico	Tatsimoet al., 2012

Além de extratos, algumas substâncias isoladas da espécie têm demonstrado notada atividade antibacteriana *in vitro*. O alcaloide identificado como 1-etanamino, 7 hex-1-yne-5I-ona fenantreno foi isolado de extratos etanólicos de folhas, possuindo atividade inibitória ao crescimento de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* (OKWU;NNAMDI, 2011a).

A atividade inibitória ao crescimento de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *K. pneumoniae* também foi observada no cultivo na presença de dois flavonoides, 5I- Metil-4I, 5, 7-trihidroxil flavona 1 e 4I, 3, 5, 7-tetrahidroxi 5-metil 5I-propenammina antocianidina 2, isolados de extratos etanólicos de folhas de *K. pinnata* (OKWU;NNAMDI, 2011b). Esta atividade também foi observada na avaliação de 6 flavonoides derivados de kaempferol isolados de extratos etanólicos da planta, sendo ativos contra *S. aureus*, *P. aeruginosa* e *Salmonella typhi* (TATSIMO et al., 2012).

O uso de extratos da espécie, juntamente com outras substâncias, pode demonstrar a otimização da atividade antibacteriana. A utilização dos extratos aquosos de *K. pinnata* e *Aloe barbadensis* utilizados isoladamente apresentaram zona de inibição mínima em concentrações de extrato em torno de 10^{-3} para *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* sp., *Proteus* sp. e *Salmonella typhi*. Por outro lado, a associação destes dois extratos em cultivo aumentou atividade contra estas cepas, reduzindo a concentração mínima efetiva para valores em torno de 10^{-9} , demonstrando alto efeito sinérgico para esta atividade (ABUBAKAR et al., 2014).

A associação de extratos à nanopartículas também se mostra como uma estratégia para o aumento da atividade medicinal. Nanopartículas de prata, obtidas a partir da associação de nitrato de prata (AgNO_3) a extratos aquosos de folhas da espécie, possuíram a capacidade de reduzir o crescimento de *E. coli* e *S. aureus* em cultivo em suspensão. A adição de 1 mM de AgNO_3 aos extratos formam nanopartículas que apresentam atividade antibacteriana superior aos extratos ou soluções de AgNO_3 avaliados sozinhos em cultura (BAISHYA et al., 2012). Isto demonstra a possibilidade da junção de diferentes ciências ao estudo da espécie na busca de agentes antibacterianos.

1.3 Relevância do estudo do potencial antibacteriano com espécies vegetais

A resistência antimicrobiana a diversos tratamentos é considerada uma ameaça mundial na área da saúde. O consumo excessivo de antibióticos para uso humano e para a produção de alimentos na cadeia produtiva animal, além de fatores como a globalização e um baixo controle de infecções facilitou o aumento da resistência em cepas de bactérias, tanto gram-positivas quanto gram-negativas, tornando urgente a busca por novos agentes antimicrobianos (HUTTNER et al., 2013).

Altas taxas de resistência têm sido observadas principalmente em bactérias associadas a doenças comuns de interesse em saúde pública, como infecções urinárias e pneumonia em todas as regiões do mundo. Entre as bactérias comumente relacionadas a infecções hospitalares e infecções à população humana estão *Escherichia coli*, *Klebsiellapneumoniae* e *Staphylococcus aureus*. Para as causadoras de infecções principalmente em comunidades carentes encontram-se dentre outras *Streptococcus pneumoniae*, *Shigella* spp. e *Neisseriagonorrhoea* (WHO, 2014).

Dentre as bactérias enteropatogênicas, *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) é a maior causadora de diarreia no mundo, sendo associada aos quadros de diarreia persistente especialmente em crianças, indivíduos infectados com HIV e viajantes vindos de países em desenvolvimento (BERRY et al., 2014). Nestes países, a causa de morte por diarreia persistente para lactentes entre 1 e 11 meses é de 30%. Em crianças até 4 anos de idade esta taxa pode chegar a 69% (RAHMAN et al., 2014).

Além de sua capacidade agregativa em células intestinais humanas, EAEC é capaz de formar biofilmes em superfícies. Esta conformação fornece resistência aos antibióticos, além de alto grau de dispersão e reinfecção, podendo representar até 80% das causas de infecções microbianas humanas (BUENO, 2014). A natureza dos biofilmes é capaz de protegê-los contra

condições adversas como dessecação, UV, compostos tóxicos e antibióticos, favorecendo a persistência. Deste modo faz-se importante a busca por novos agentes antimicrobianos com ação contra biofilmes (ABDEL-AZIZ; AERON, 2014).

Na busca por novos agentes antimicrobianos, diversas substâncias oriundas de produtos naturais têm sido avaliadas, recebendo aquelas de origem vegetal grande destaque em suas propriedades antibacterianas (GYAWALI; IBRAHIM, 2014). As atividades biológicas de produtos naturais muitas vezes não são decorrentes de apenas um metabólito isolado, mas de uma combinação de diferentes substâncias, sendo validada a utilização de extratos vegetais brutos (SARANRAJ; SIVASAKTHI, 2014).

Grande parte da atividade antimicrobiana de extratos vegetais está relacionada à ação de flavonoides, substâncias que apresentam também importância nutracêutica, devido às suas propriedades organolépticas em alimentos e atividades farmacológicas na saúde humana (TAPAS et al., 2008).

Os flavonoides são os principais representantes dos compostos fenólicos, que integram o metabolismo secundário vegetal. Mesmo não sendo produzidos pelo metabolismo humano, os flavonoides apresentam diversas atividades farmacológicas, como antialérgica, anti-inflamatória, vasodilatadora e antiulcerogênica. Já foram identificadas mais de quatro mil substâncias pertencentes ao grupo, tendo destaque para *K. pinnata*, as substâncias do grupo dos flavonóis, como a quercetina e a rutina (LOPES et al., 2000).

Aos flavonoides, incluído quercetina, têm sido apontadas importantes propriedades antimicrobianas e antiparasitária, como antileishmania (MUZITANO et al., 2006, MUZITANO et al., 2011) e antibacteriana (GATTO et al., 2002, MITTA et al., 2014, PRASAD et al., 2014), mostrando-se metabólitos de grande interesse em estudos antimicrobianos.

Dessa forma, torna-se relevante o estabelecimento de sistemas *in vitro* para a produção contínua de substâncias bioativas com potencial antimicrobiano, sendo de especial interesse a avaliação de flavonoides em espécies da família Crassulaceae.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Estabelecer protocolos de cultivo *in vitro* de *Kalanchoe pinnata* visando à produção de metabólitos com potencial antibacteriano, comparando ao material cultivado *in vivo*.

2.2 Específicos

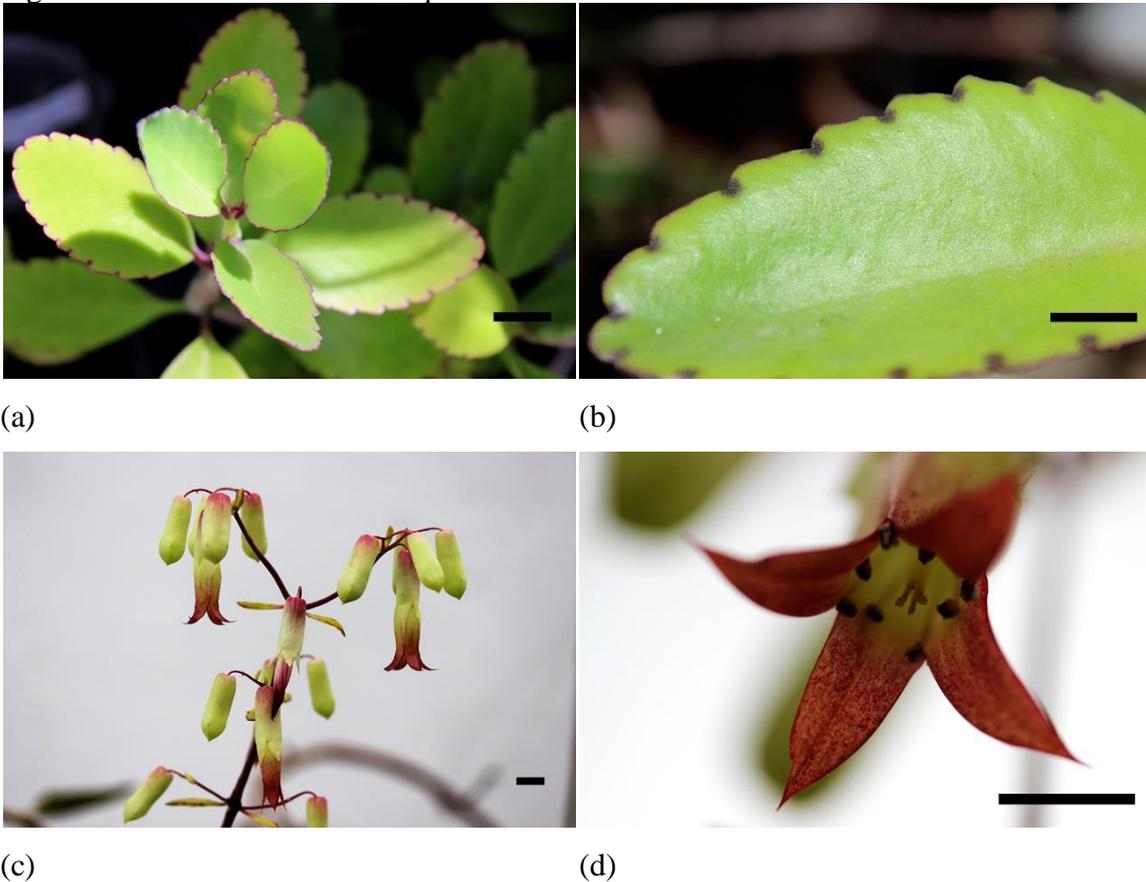
- Avaliar a resposta morfogênica *in vitro* de diferentes explantes a partir da suplementação do meio MS com diferentes fontes de carbono e fitorreguladores;
- Analisar extratos oriundos de plantas obtidas *in vitro* e *in vivo* para indicação farmacognóstica e possível presença de flavonoides;
- Avaliar a citotoxicidade de extratos e de substâncias ocorrentes em *K. pinnata* obtida *in vivo* e *in vitro*;
- Avaliar o potencial antibacteriano de extratos e substâncias ocorrentes em *K. pinnata* obtida *in vivo* e *in vitro*;
- Avaliar o potencial de inibição na formação de biofilmes de extratos e substâncias ocorrentes em *K. pinnata* obtida *in vivo* e *in vitro*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material botânico

Exemplares de *Kalanchoe pinnata* foram acessados no bairro de Jacarepaguá (Rio de Janeiro RJ – 22°57'29.7"S, 43°21'13.3"W) e cultivados *in vivo* em telado (Figura 3) no Pavilhão Haroldo Lisboa da Cunha (PHLC), na Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ), Campus Maracanã. Um exemplar *tipo* foi depositado no Herbário da UERJ sob registro HRJ 12515.

Figura 3 – Plantas de *Kalanchoe pinnata* cultivadas em telado no PHLC/UERJ.



Legenda: (a) Filotaxia; (b) detalhe da folha com bordo crenado; (c) aspecto da inflorescência destacando a coloração; (d) detalhe da flor.

Nota: Comprimento de barras de 1 cm.

3.2 Cultura de tecidos de *K. pinnata*

3.2.1 Estabelecimento *in vitro* de *K. pinnata*

Folhas de exemplares cultivados *in vivo*, em área sombreada, foram utilizadas como fontes de explantes. O material foi lavado em água corrente e detergente comercial neutro, seguido de lavagem com solução de hipoclorito de sódio (NaClO) a 2%, sob agitação constante, por 10 minutos. Em seguida, o material foi enxaguado três vezes com água destilada estéril em câmara de fluxo laminar, sob condições assépticas.

Foram utilizados explantes de nervura mediana e do bordo foliar, incluindo as gemas foliares, excisados em câmara de fluxo laminar após a esterilização. Cada explante de 1 cm² foi inoculado em meio de cultura estéril com a face abaxial em contato com o meio.

Todos os experimentos foram mantidos em câmara de crescimento, sob fotoperíodo de 16h e temperatura de 26±2°C.

3.2.2 Uso de diferentes fontes de carbono na regeneração *in vitro* de *K. pinnata*

Explantes de bordo foliar contendo gemas foram inoculados em meio de cultura contendo sais e vitaminas da formulação de Murashige e Skoog (1962), denominado meio MS, na ausência de fitorreguladores (MSØ), solidificado com 0,8% de ágar e com pH final ajustado para 5,8, com esterilização a 121°C por 15 minutos. Como fontes doadoras de carbono, foram utilizados os açúcares Dextrose, Sacarose e Sorbitol, nas concentrações de 60, 90 e 120 mM.

Foram inoculados explantes em frascos de vidro de 6,5 x 8,5 cm, vedados com tampas de polipropileno. Para cada tratamento, foram utilizados 32 explantes, sendo inoculados quatro explantes por frasco. A avaliação foi realizada após 60 dias de cultivo, sendo registrados a porcentagem de regeneração, o número e o comprimento de folhas e raízes.

A aclimatização das plantas desenvolvidas *ex vitro* foi realizada em telado sob luminosidade natural tendo como substrato terra preta adubada. As plantas foram transferidas diretamente da condição *in vitro* para *ex vitro*, sendo mantidas pelo período de sete dias, em área sombreada, e posteriormente expostas à luminosidade natural, recebendo duas regas por dia.

3.2.3 Uso de fitorreguladores na resposta morfogênica *in vitro* de *K. pinnata*

Acrescidos ao meio MS sólido suplementado com 90 mM de sacarose (aproximadamente 30 g.L⁻¹), foram utilizados diferentes fitorreguladores na concentração de 5 µM, concentração para estímulo à resposta morfogênica *in vitro* para citocininas ou auxinas isoladamente em explantes da espécie (SANTOS et al. 2014). Do grupo das substâncias com ação citocinínica foram utilizados KIN, BAP e TDZ e do grupo das auxinas, ANA, AIB, PIC e 2,4-D.

Para cada tratamento foram inoculados 20 explantes foliares contendo a nervura mediana ou o bordo com uma gema, sendo inoculados quatro explantes por frasco de 6,5 x 8,5 cm, vedados com tampas de polipropileno. Após 60 dias de cultivo, foram aferidas as biomassas, expressas em peso seco, de plantas (parte aérea e raízes), culturas de raízes e culturas de células em suspensão.

3.2.4 Avaliação da morfogênese em explantes obtidos *in vitro*

Explantes foliares e radiculares obtidos de plantas produzidas *in vitro* em meio MS sólido na ausência de fitorreguladores foram posteriormente cultivados em frascos do tipo erlenmeyer de 125 mL de volume e 5,5 x 10,5 cm, vedados com tampas de alumínio e filme plástico.

Explantes foliares, compreendendo a folha inteira medindo cerca de 1x1 cm, e 1 g de raízes foram inoculados em meio MS líquido, na ausência ou presença das auxinas PIC, ANA, 2,4-D e AIB ou citocininas KIN, BAP e TDZ, na concentração de 5µM. Foram utilizados cinco explantes foliares por frasco, sendo todos os cultivos em meio líquido mantidos sob agitação constante a 114 rpm em agitador orbital. A avaliação se deu após 60 dias de cultivo em sala de crescimento, sob fotoperíodo de 16h e temperatura de 26±2°C.

3.3 **Análise fitoquímica**

3.3.1 Preparo de extratos e substâncias ocorrentes em *K. pinnata*

Para análise fitoquímica e avaliação do potencial medicinal de *K. pinnata*, foram utilizados extratos aquosos e metanólicos de folhas obtidas de plantas cultivadas *in vivo*, *in vitro* e aclimatizadas. Para a parte vegetativa *in vivo*, plantas obtidas *in vitro*, culturas de raízes e culturas de células em suspensão, foram preparados extratos metanólicos. Os flavonoides quercetina e rutina foram utilizados como substâncias representativas de flavonoides ocorrentes na espécie (MUZITANO et al., 2011).

Os extratos aquosos foram preparados de acordo com o proposto por Muzitano e colaboradores (2011). Para a extração, foi utilizada a parte aérea de plantas cultivadas *in vitro*

em meio MS ausente de fitorreguladores e folhas de plantas cultivadas *in vivo* e de plantas aclimatizadas, provenientes de regeneração em meio MS. As plantas cultivadas *in vivo* foram coletadas no verão, sendo cultivadas em telado sob iluminação natural.

O material fresco foi macerado mecanicamente com o auxílio de alofariz e pistilo e posteriormente aquecido em água destilada a 20% (proporção em peso de material fresco por volume de água, p/v) a 50°C por um período de 30 minutos. Após este período, o material foi filtrado, congelado a -20°C e posteriormente liofilizado a -59°C sob pressão de 60 µmHg. Após a liofilização, o material foi ressuspenso em água destilada estéril nas concentrações necessárias para experimentação.

Para a extração metanólica foram utilizadas folhas, caules e raízes de material obtido *in vivo* em cultivo sob luminosidade natural e coletado no verão. Dos sistemas *in vitro*, foram utilizadas para extração a cultura de raízes, culturas de células em suspensão e parte aérea de plantas obtidas em meio MS sólido sem fitorreguladores.

Todo material foi seco em estufa a 40°C, macerado mecanicamente em almofariz e pistilo e imerso em metanol sendo mantido no escuro com agitação constante em shaker a 114 rpm. A cada dois dias o solvente foi removido, reservado e adicionado novo solvente ao material. Após sete dias, todo o solvente reservado de cada material foi removido e o extrato concentrado em rotaevaporador a 45°C.

Os flavonoides quercetina e rutina (Sigma-Aldrich®) foram solubilizados em 1 mg de substância por mL de metanol.

3.3.2 Ensaio fitoquímicos indicativos das classes de metabólitos

A análise preliminar para detecção de flavonoides, alcaloides, saponinas, fenóis e taninos foi realizada segundo protocolo exposto por Barbosa (2001).

Foram avaliados extratos metanólicos de folha, caule e raiz de planta cultivada *in vivo* e parte aérea de planta obtida *in vitro* em meio MSØ, além de cultura de raízes e cultura de células em suspensão. Foram avaliados também extratos aquosos de folhas, provenientes de planta obtida *in vivo*, parte aérea obtida *in vitro* em meio MSØ e folhas de plantas aclimatizadas.

Para o teste com alcaloides foram utilizados dois reativos indicativos de presença. O Reativo de Mayer foi preparado a partir da solução de 1,36 g de cloreto de mercúrio dissolvido em 60 mL de água destilada e 5 g de iodeto de potássio dissolvidos em 20 mL de água destilada, diluídas para um volume final de 100 mL de solução. Para o Reativo de Bouchardat, foi preparada solução com 4 g de iodeto de potássio e 2 g de iodo ressublimado diluídos em 100 mL de água destilada.

Dos extratos secos, 20 mg de cada foram dissolvidos em 5 mL de solução de ácido clorídrico a 5%. Após a filtração, foram adicionadas três gotas dos reativos em cada tubo de ensaio contendo extrato e em tubos contendo água destilada como controle negativo. A observação da formação de um precipitado de coloração branca, no Reativo de Mayer, e de coloração laranja avermelhado para reação com o Reativo de Bouchardat são resultados positivos da presença de alcaloides.

Para o teste preliminar para a detecção de flavonoides, 20 mg dos extratos foram dissolvidos em 20 mL de água destilada. Após a filtração, o material foi transferido para dois tubos de ensaio, sendo em um tubo o extrato acidulado para pH 3 e no outro alcalinizado a pH 11. A presença de diferentes tipos de flavonoides foi visualizada de acordo com a alteração da coloração do extrato em pH ácido e básico.

Para a análise da presença de saponinas nos extratos analisados, 20 mg de cada foram dissolvidos em 5 mL de água destilada e diluídos para 15 mL. Após agitação vigorosa por 2 minutos em tubo fechado, a formação de uma camada de espuma estável por mais de 30 minutos foi considerada resposta positiva para saponinas espumílicas.

Por fim, a análise para fenóis e taninos foi realizada a partir da solubilização de 10 mg de cada extrato em 5 mL de água destilada. Após a filtração, o extrato foi transferido para um tubo de ensaio onde foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de perclorato de ferro a 1%. Qualquer mudança na coloração ou formação de precipitado foi considerada indicativa de reação positiva, quando comparada com o tubo de controle negativo. Extratos que apresentaram coloração inicial entre o azul e o vermelho foram indicativos da presença de fenóis. A formação de precipitado escuro de tonalidade azul indicou a presença de taninos pirrogálicos, enquanto o precipitado verde indicou a presença de taninos catéquicos.

3.3.3 Análise de flavonoides livres e ligados a açúcares

Esta etapa do trabalho foi realizada na Central Analítica Fernanda Coutinho, no Pavilhão Haroldo Lisboa da Cunha, na UERJ, com auxílio do farmacêutico Eduardo Nunes da Fonseca.

O método analítico para avaliação da presença de flavonoides ligados a açúcares foi estabelecido segundo protocolo de Costa e colaboradores (2011). A análise dos extratos se deu por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrofotometria em ultravioleta com detector por arranjo de diodos (CLAE-UV-DAD), utilizando o aparelho (Dione Ultimate 3000) acoplado a uma coluna C18 (Dione Bonde Sílica Produtos, μM , 4,6 x 250mm, 5 μm).

A fase móvel foi constituída de um gradiente composto por solução de água milli-Q acidificada com ácido acético glacial a 1%, com pH ajustado para 3 (solução A) e aceto nitrila

(Solução B). Nos tempos de 0 a 30 minutos foi empregada variação linear de A - B na proporção de 95:5 (v/v) até 80:20 (v/v). De 30 a 40 minutos foi estabelecida a condição isocrática, com A - B a 80:20 (v/v). Por fim, de 40 a 47 minutos ocorreu a variação linear de A - B de 80:20 (v/v) até 95:5 (v/v), reestabelecendo a condição inicial. A taxa de fluxo do efluente foi mantida constante a 1 mL/min, realizada em temperatura ambiente. A detecção foi realizada a 340 nm.

Após o estabelecimento do método analítico, o material foi analisado quanto à presença de flavonoides livres. Para esta análise foi utilizada a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrofotometria em ultravioleta seguida de ionização por elétron spray e espectrometria de massas (CLAE-UV-IES-EM), em comprimento de onda de 254 nm. Para realização da CLAE foi utilizado um aparelho UPLC Shimizu composto por degaseificador (DEU20AS), duas bombas (LC20AD), injetor automático (SIL20AC), detector de UV com comprimento de onda fixo (SPD20A), forno (CTO20A) e interface (CSM20A).

A separação das amostras foi realizada em coluna theromoscientific RP18 (250 mm x 4,6 mm, com partícula de 5 Å), com fluxo da fase móvel de 0,5 mL.min⁻¹ sem programação de temperatura. A fase móvel consistiu em um gradiente do tipo rampa, tendo início com 100% de água MilliQ acidificada com ácido acético glacial a pH 3,0 e 0% de acetonitrila. Em 120 minutos as concentrações iniciais foram invertidas para 0% de água acidificada e 100% de acetonitrila, reestabelecendo-se a condição inicial em 126 minutos.

Após a passagem pelo detector de UV com lâmpada fixa em 254 nm, a fase móvel foi gaseificada pela técnica de Ionização por eletron spray no micrOTOF, em temperatura de 200°C com fluxo de 9 µL.min⁻¹ e pressão de 4 psi.

O espectrômetro de massas foi calibrado com solução de formiato de sódio 0,1 µM e foi feita a varredura de massas com m/z 50 a 3000, no modo de ionização negativo. A energia de ionização foi de 10 eV com análise somente de varredura MS.

3.4 Avaliação da citotoxicidade de extratos de *Kalanchoe pinnata*

3.4.1 Linhagens celulares

Foram utilizadas para esta etapa do estudo as linhagens celulares HEp-2 (ATCC CCL23, originária de carcinoma de laringe humana), Caco-2 (ATCC HTB37, originária de adenocarcinoma de cólon humano) e T84 (ATCC CCL248, originária de carcinoma colo-retal). Estas linhagens foram obtidas no Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UERJ, local aonde foram realizados os ensaios de citotoxicidade, antibacteriano e

antibiofilme, sendo utilizados protocolos para as análises rotineiramente empregados neste departamento com modificações necessárias.

3.4.2 Cultivo e manutenção celular

As células HEp-2 foram cultivadas em frascos plásticos contendo 5 mL de meio de cultura essencial MEM (MinimalEssentialMedium, Gibco-BRL) na presença de antibióticos, sendo 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicina e 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de fungizona. As culturas foram suplementadas com 5% de soro fetal bovino (SFB, Gibco) e 0,5% de glutamina 2,5 mM, sendo mantidas em estufa a 37°C com 5% de CO₂, por cerca de 2 a 3 dias, até atingir a confluência. O subcultivo foi realizado a cada 2 ou 3 dias.

A linhagem celular Caco-2 foi cultivada em frasco contendo meio de cultura essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM; Gibco-BRL) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina 2,5 mM, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicina e 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de fungizona. As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera 5% CO₂, ocorrendo a troca de meio a cada 2 ou 3 dias e o subcultivo a cada 7 ou 8 dias.

A linhagem celular T84 foi cultivada em frasco contendo uma mistura de meio Ham F12 e meio DMEM na proporção 1:1 (Gibco-BRL), acrescido de 10% de SFB, L-glutamina 2,5 mM, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de gentamicina e 2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de fungizona. As células foram mantidas em estufa a 37°C com atmosfera 5% CO₂, recebendo troca de meio a cada 2 ou 3 dias e o subcultivo a cada 7 ou 8 dias.

Para o subcultivo das linhagens, os tapetes foram recobertos com solução de tripsina-EDTA (tripsina 0,2% e EDTA 0,02% em PBS 0,01 M com pH 7,2) (Bird & Forrester, 1981). Após a remoção da solução, as células foram desprendidas suavemente utilizando-se pipeta com meio de cultura completo. A suspensão contendo as células foi então dividida em dois novos frascos, que foram incubados a 37°C, em atmosfera 5% CO₂ e 95% O₂ até a confluência dos tapetes celulares.

3.4.3 Bioensaio de citotoxicidade com extratos e flavonoides ocorrentes em *Kalanchoepinnata* obtidos *in vivo* e *in vitro*

Foram avaliados extratos de *K. pinnata* quanto à citotoxicidade em concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os extratos metanólicos, 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os extratos aquosos e 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os flavonoides quercetina e rutina. O ensaio foi realizado em placas de 96 poços, apresentando tapetes celulares confluentes e aderidos, em volume de meio de cultura de 100 μL por poço. Sobre as culturas foram adicionados os diferentes extratos e substâncias

solubilizados em PBS-D, mantendo-se em seguida o cultivo por 24h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. No período correspondente a três horas antes do término do cultivo (21h) foram adicionados 5 mg.mL⁻¹ de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT). Após este período, a placa foi centrifugada a 3000 rpm por 5 minutos para deposição dos cristais de MTT formados. O sobrenadante foi descartado e os cristais solubilizados pela adição de 100 µL de DMSO (100%) em cada orifício. A leitura foi realizada em leitor de microplacas a 492 nm. Como controles negativos foram utilizados os cultivos celulares na ausência de tratamento e o cultivo na presença de 5% de metanol. Como controle positivo, as células foram cultivadas na presença de metanol 100%.

3.5 Avaliação do potencial antibacteriano de *K. pinnata*

3.5.1 Isolamento de cepas

Em todos os ensaios foram utilizadas cepas de referência, obtidas em sua maioria do American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, EUA). As demais cepas foram oriundas da coleção do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia da UERJ. Foram utilizadas cepas bacterianas (Quadro 1), englobando Gram-positivas e Gram-negativas de interesse clínico em saúde pública.

Para montagem do estoque, as cepas foram semeadas com o auxílio de alças descartáveis estéreis em placas de petri de 90 mm de diâmetro, contendo 20 mL de meio de cultivo sólido Mueller-Hintonagar (MHA, Oxoid Ltda.). O material semeado foi mantido em estufa a 37°C por 18h para crescimento. Utilizando alças, as colônias formadas nas culturas foram removidas e adicionadas em meios para estoque. As cepas foram estocadas a -70°C em meio Tryptic Soy Broth (TSB, Merck®) e Skim Milk (Sigma-Aldrich®) acrescidos de 20% de glicerol, para impedir a cristalização do material em congelamento.

Quadro 1 – Cepas utilizadas nos ensaios para avaliação do potencial antibacteriano de *Kalanchoe pinnata*.

Gram-positivas		Gram-negativas	
Espécie	Cepa	Espécie	Cepa
<i>Bacillusthuringiensis</i>	ATCC 33679	<i>Citrobacterfreundii</i>	ATCC 12241
<i>Enterococcusfecalis</i>	29212	<i>Escherichia coli</i>	EAEC 17-2
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcussaprophyticus</i>	ATCC 15305	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218
<i>Staphylococcussimulans</i>	ATCC 27851	<i>Escherichia coli</i>	042
<i>Streptococcus pyogenes</i>	8668	enteroagregativa(EAEC)	
		<i>Escherichia coli</i> K-12	C600
		<i>Escherichia coli</i> K-12	HB 101
		<i>Klebsiellapneumoniae</i>	ATCC 700603
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
		<i>Salmonella</i>	
		entericaserovarTyphimuri	C20
		um	
		<i>Serratiamarcescens</i>	7145
		<i>Shigellasonnei</i>	ATCC 25931

3.5.2 Ensaio de macrodiluição

A avaliação do potencial antimicrobiano dos extratos e substâncias foi realizada a partir do método do ensaio de diluição em ágar (macrodiluição), utilizado por Soberón e colaboradores (2007), com algumas modificações.

As cepas bacterianas dos estoques foram cultivadas para crescimento em tubos de ensaio de 15 x 100 mm contendo 3 mL de meio Mueller-HintonBroth (MHB, Oxoid, Ltda.) mantidas em estufa por 18h a 37°C. Após a fase de crescimento, as culturas obtidas foram aliqüotadas em tubos de polipropileno estéreis para manipulação em trabalho.

Os diferentes extratos e substâncias avaliados foram solubilizados em 20 mL de MHA, em torno de aproximadamente 50°C, em meio ainda não solidificado e o conteúdo final despejado em placas de petri de 90 mm. Extratos de *K. pinnata* foram avaliados em concentração máxima de 1000 µg.mL⁻¹. Como controles negativos do experimento foram utilizados o meio MHA puro e o mesmo meio acrescido de 1% e 10% de MeOH, concentração final após a solubilização de quercetina e rutina nas concentrações de 10 e 100 µg.mL⁻¹, respectivamente. Resultados de cepas que sofreram alteração no crescimento por influência do solvente foram sinalizados, porém desconsiderados para resposta positiva da atividade dos flavonoides.

Para cada placa de tratamento foram semeados 2 µL de cada suspensão bacteriana em duplicata. Após 24h de incubação em estufa a 37°C, o crescimento bacteriano foi avaliado. Todo material e meios de cultivos foram previamente esterilizados por autoclavagem a 121°C e pressão por 20 minutos.

3.5.3 Avaliação do potencial de inibição na formação de biofilmes de EAEC 042

A avaliação do estabelecimento de biofilmes de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC 042) foi realizado a partir do ensaio espectrofotométrico de inibição de biofilme, utilizando como referência o trabalho de Namasivayame Roy (2013) com algumas modificações.

As suspensões bacterianas foram padronizadas e ajustadas a 0.14 nm de densidade óptica (D.O.) em 520 nm, sendo adicionados 100 µL da suspensão em placas de 96 poços. Em seguida foram adicionados os extratos e substâncias ocorrentes em *K. pinnata* em triplicata, sendo mantido o cultivo em incubação por 18h a 37°C. Extratos aquosos foram avaliados nas concentrações de 500 e 1000 µg.mL⁻¹, extratos metanólicos na concentração de 1000 µg.mL⁻¹ e os flavonoides quercetina e rutina ambos nas concentrações de 5 e 50 µg.mL⁻¹.

Após a incubação, o sobrenadante foi descartado e foram adicionados 100 µL de solução corante de cristal violeta 1% (p/v) por 30 minutos. Após este período, a solução foi removida e os poços foram gentilmente lavados com PBS-D, sendo em seguida adicionados 100 µL de etanol 95%, mantendo em incubação por 15 minutos para solubilização dos cristais. A leitura foi realizada em leitor de microplacas a 570 nm. O cálculo do índice de inibição do crescimento de biofilmes, expresso em porcentagem, se deu de acordo com a fórmula:

$$\text{Índice de inibição (\%)} = \frac{\text{D.O. no controle} - \text{D.O. no tratamento} \times 100}{\text{D.O. no controle}}$$

3.5.4 Avaliação do potencial antibiofilme da quercetina sobre biofilmes individuais e misto

As condições de obtenção de suspensões bacterianas e cultivo em placa de 96 poços se deu similarmente à forma apresentada no item 3.5.3. Foram utilizadas para este experimento a cepa de EAEC 042, como representante gram-negativa e *S. aureus* (ATCC 25923) como representante gram-positiva.

Para a avaliação de cepas individualmente, foram inoculados 100 µL de suspensão bacteriana de cada cepa por poço. Para avaliação de biofilme misto, foram inoculados 50 µL de EAEC 042 e 50 µL de *S. aureus* no mesmo poço, totalizando o volume de 100 µL de suspensão bacteriana.

Inicialmente foram estabelecidas as concentrações inibitórias a 50% do crescimento bacteriano (IC50) e concentração inibitória mínima (MIC) para EAEC 042 e *S. aureus* isoladamente ou cultivadas juntas em mistura. As cepas foram inoculadas nos orifícios em sextuplicata na presença de quercetina em concentração crescente de 1 a 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e mantidas em estufa por 18h a 37°C. A leitura se deu em leitor de microplacas a 492 nm sendo feita a diferença entre a D.O. obtida nos poços de tratamento e nos poços de branco, constituídos por um volume de 200 μL de meio de cultura acrescido de diferentes concentrações correlatas de quercetina, sem bactérias.

Para a avaliação de biofilmes, foram mensuradas a concentração inibitória na formação de 50% de biofilmes (BIC50) e a mínima concentração inibitória da formação de biofilmes (MBIC). As cepas foram avaliadas isoladamente ou em mistura, na presença de concentrações de quercetina de 1 a 250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ segundo protocolo descrito no item 3.5.3 para avaliação de biofilmes.

Todos os experimentos foram realizados em sextuplicatas e repetidos ao menos três vezes.

3.6 Análise estatística

Para os experimentos de cultivo *in vitro* de *K. pinnata*, citotoxicidade de extratos e avaliação antibiofilme, foi observada a diferença estatística entre os tratamentos a partir da análise de variância dos dados, utilizando o programa GraphPad Prism®. A indicação da diferença significativa ($p < 0,05$) entre os resultados se deu a partir do teste de comparação múltipla de Tukey. A comparação da diferença estatística em relação a um controle específico se deu pelo pós-teste de Dunnett ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS

4.1 Cultura de tecidos de *K. pinnata*

4.1.1 Influência da fonte de carbono na regeneração *in vitro*

O protocolo de descontaminação mostrou-se eficiente para a manutenção da viabilidade do material *in vitro*, não permitindo a contaminação em 100% dos explantes.

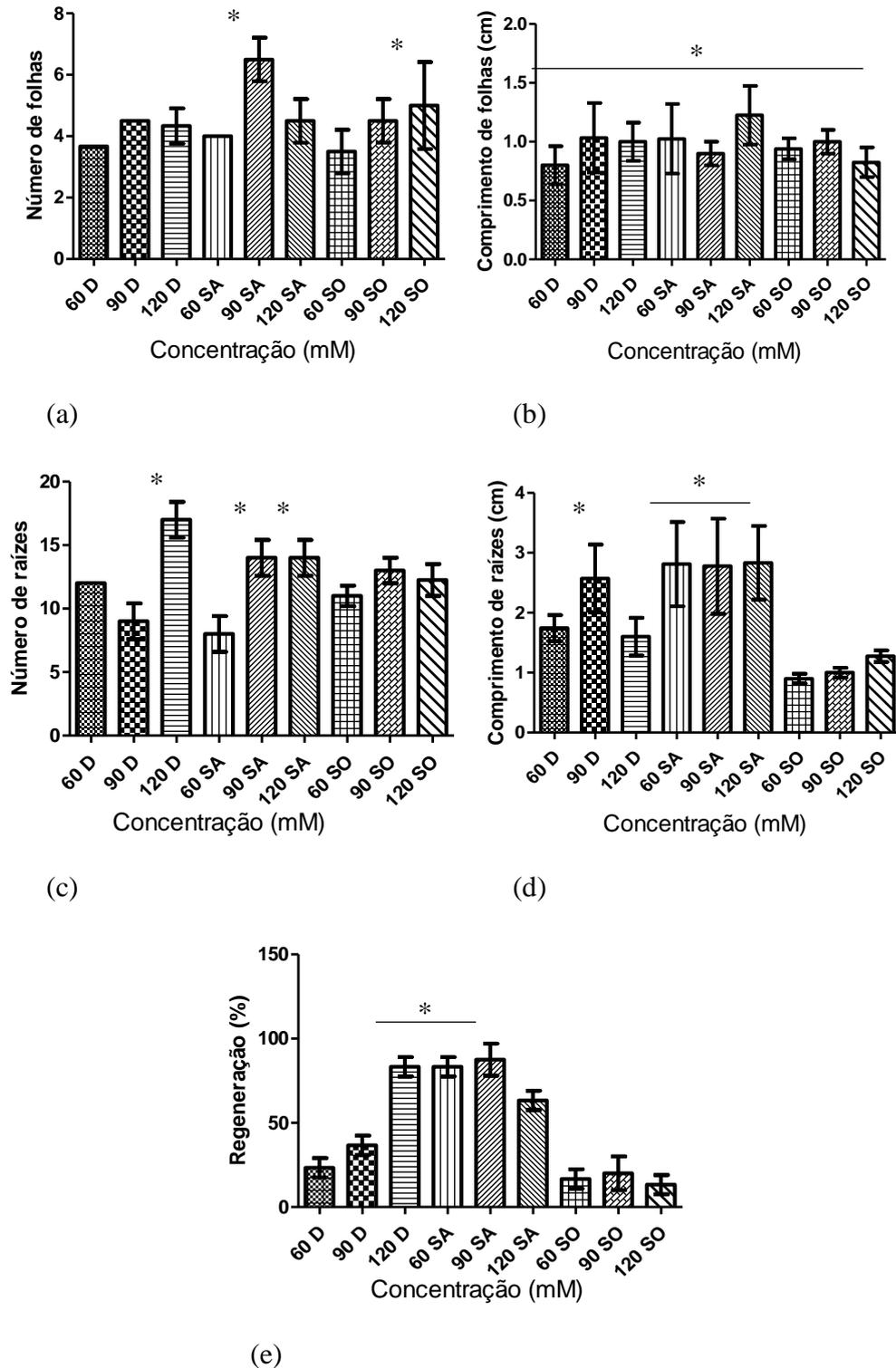
As gemas foliares presentes nos explantes obtidos de plantas *in vivo* mostraram-se competentes na regeneração de plantas completas *in vitro*. Estas puderam ser recultivadas a partir da inoculação de folhas obtidas *in vitro* em meio MS sem fitorreguladores, podendo este processo ser repetido por período indeterminado.

Das diferentes fontes de carbono utilizadas para a regeneração de gemas em meio MS, a sacarose mostrou-se como o açúcar mais adequado ao desenvolvimento de plantas (Figura 4). Explantes cultivados em meios suplementados com dextrose ou sorbitol apresentaram baixa taxa de regeneração, com exceção do tratamento com dextrose na concentração de 120 mM, que apresentou taxa comparável à de sacarose (Figura 4).

Em todos os tratamentos com suplementação de sacarose foram observadas plantas normais após 30 dias de cultivo (Figura 5).

Plantas obtidas em meio suplementado com 90 mM de sacarose (Figura 6a) mostraram-se plenamente competentes à aclimatização, não sofrendo com o processo de transferência para a condição *ex vitro* (Figura 6b).

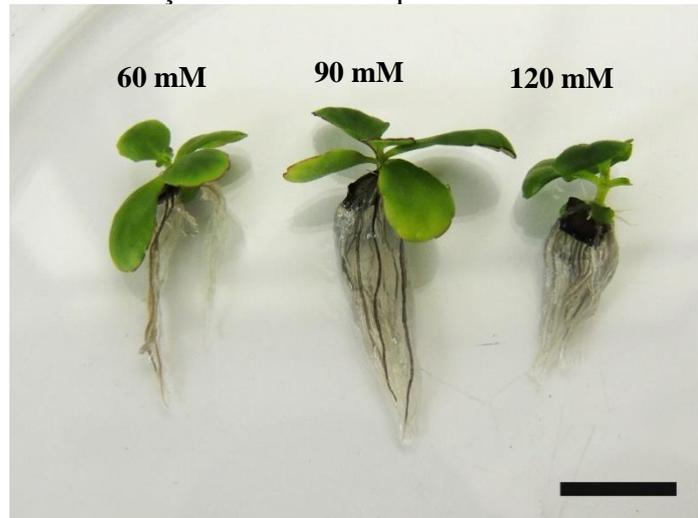
Figura 4 – Regeneração *in vitro* de *Kalanchoe pinnata* a partir de explantes foliares contendo gema na presença de diferentes fontes de carbono em meio MS sem fitorreguladores, após 60 dias de cultivo.



Legenda: (a) – número de folhas; (b) – comprimento de folhas; (c) – número de raízes; (d) – comprimento de raízes; (e) – porcentagem de regeneração.

Nota: Valores marcados com asterisco (*) não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). D – dextrose; SA – sacarose; SO – sorbitol.

Figura 5 – Plantas de *Kalanchoe pinnata* regeneradas *in vitro* em meio MS suplementado com diferentes concentrações de sacarose após 30 dias de cultivo.



Nota: Comprimento da barra de 1 cm.

Figura 6 – Aclimatização de *Kalanchoe pinnata* após 60 dias de cultivo *in vitro* em meio MS com 90 mM de sacarose.



(a)

(b)

Legenda: (a) – Plantas cultivadas *in vitro* em meio de cultura MS; (b) – Plantas aclimatizadas após 14 dias em substrato de terra preta.

Nota: Comprimento das barras de 1 cm.

4.1.2 Uso de fitorreguladores na resposta morfogênica *in vitro* de *K. pinnata*

Os fitorreguladores testados foram capazes de estimular o desenvolvimento morfogênico de explantes de planta cultivada *in vivo* em diferentes tecidos (Tabela 2). Utilizado como controle, o meio MS ausente de fitorreguladores estimulou o desenvolvimento de plantas a partir do explante de gema foliar, não promovendo, no entanto, resposta morfogênica em explantes de nervura mediana.

O tratamento com as auxinas picloram e 2,4-D promoveu a proliferação de calos nos explantes contendo nervura mediana, tendo o 2,4-D sido competente na proliferação de calos também em explantes de gemas foliares. Ambos os tratamentos produziram massa calogênica que não diferiu estatisticamente entre si em sua biomassa. Para as gemas foliares cultivadas na presença de picloram, houve a proliferação de raízes, sendo este o único tratamento que apresentou tal resposta (Figura 7).

A partir de explantes de gemas foliares cultivadas em meio MS sólido, foram obtidas plantas nos tratamentos com as citocininas KIN, BAP, TDZ (Figura 8) e as auxinas ANA e AIB. Os tratamentos com estas auxinas induziram os maiores valores de peso seco de parte aérea, tendo o tratamento com ANA gerado a maior biomassa radicular. Nenhum destes fitorreguladores na concentração de 5 μ M foi capaz de estimular resposta morfogênica em explantes de nervura mediana, ausentes de gemas.

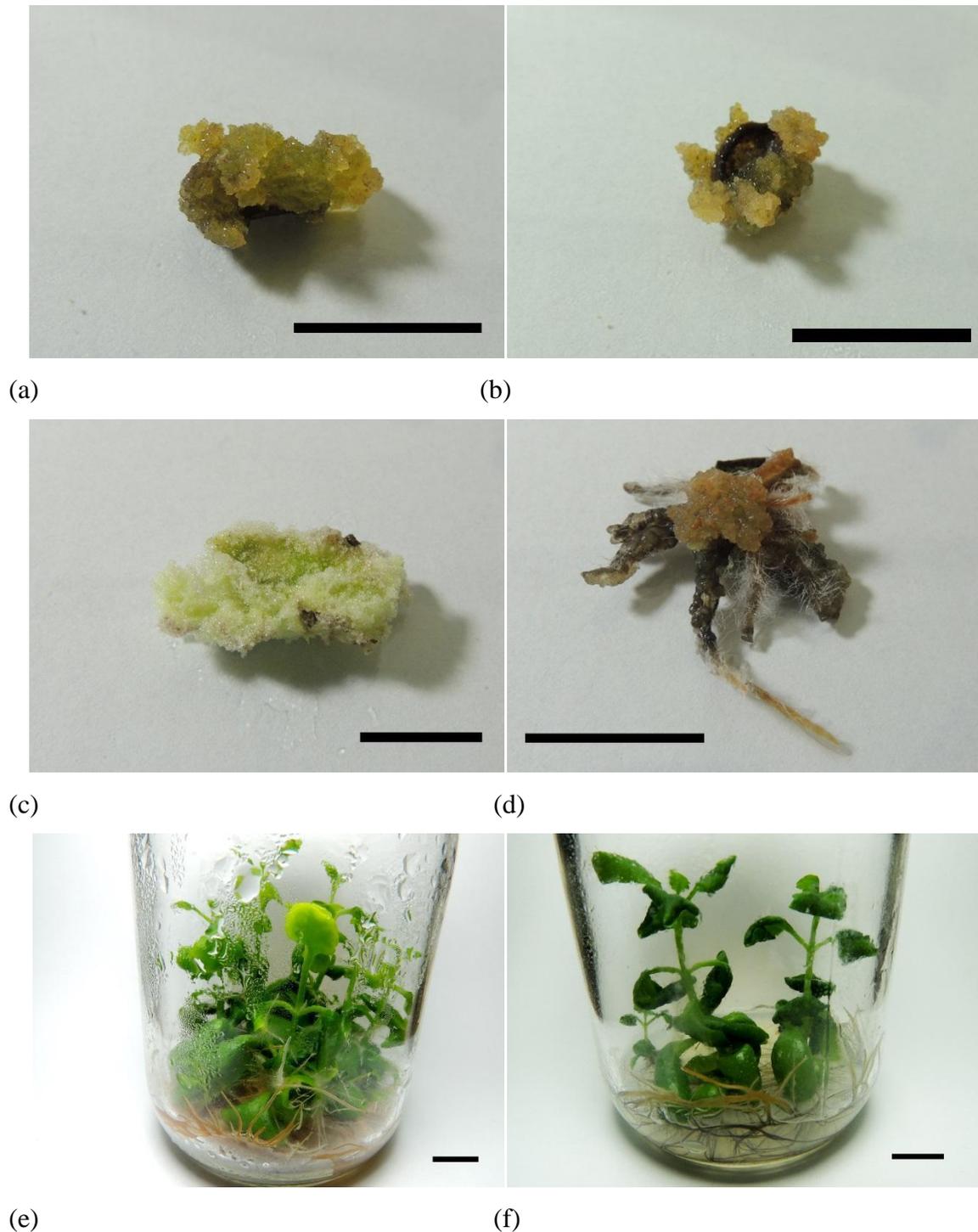
Tabela 2 – Respostas morfogênicas de explantes foliares de *Kalanchoe pinnata* após 60 dias de cultivo *in vitro*, em meio MS sólido acrescido de diferentes fitoreguladores na concentração de 5 μ M.

Tratamento	Explante	Respostas (Peso seco em grama)			
		Plantas		Culturas <i>in vitro</i>	
		Parte Aérea	Raízes	Calos	Raízes
(MSØ)	Gema	0,028±0,007	0,010±0,006	-	-
	Nervura	-	-	-	-
KIN	Gema	0,043±0,007	0,025±0,005	-	-
	Nervura	-	-	-	-
BAP	Gema	0,015±0,009	-	-	-
	Nervura	-	-	-	-
TDZ	Gema	0,012±0,003	-	-	-
	Nervura	-	-	-	-
ANA	Gema	0,074±0,021*	0,075±0,019*	-	-
	Nervura	-	-	-	-
AIB	Gema	0,074±0,032*	0,040±0,010	-	-
	Nervura	-	-	-	-
PIC	Gema	-	-	-	0,026±0,012
	Nervura	-	-	0,029±0,008*	-
2,4-D	Gema	-	-	0,022±0,010*	-
	Nervura	-	-	0,021±0,005*	-

Nota 1: Em cada coluna, valores marcados com (*) não diferem estatisticamente entre si ($p > 0.05$).

Nota 2: Para os explantes responsivos ao tratamento hormonal, a resposta foi de 100% de indução morfogênica. As respostas não observadas estão marcadas com um traço (-).

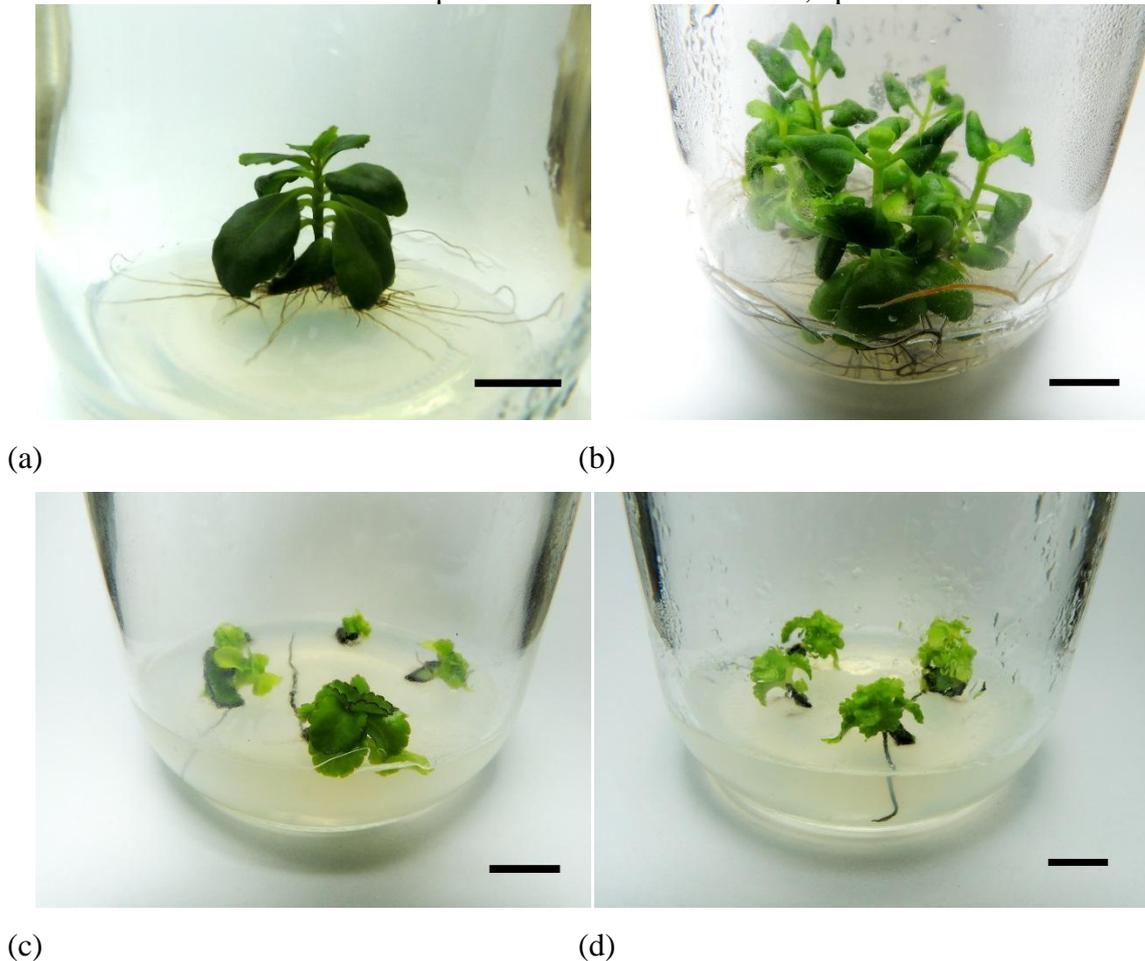
Figura 7 – Respostas morfogênicas de explantes foliares de *Kalanchoe pinnata* cultivados em meio MS sólido com 5 μ M de diferentes auxinas, após 60 dias de cultivo.



Legenda: Cultivo a partir de explantes foliares em meio MS suplementado com 5 μ M de auxinas. (a) – nervura em 2,4-D; (b) – gema em 2,4-D; (c) – nervura em PIC; (d) – gema em PIC; (e) – gemas em ANA; (f) – gemas em AIB.

Nota: Comprimento de barras de 1 cm.

Figura 8 – Respostas morfogênicas de explantes foliares de *Kalanchoe pinnata* cultivados em meio MS sólido com 5 μ M de diferentes citocininas, após 60 dias de cultivo.



Legenda: (a) – Cultivo de gemas em meio MS ausente de fitorreguladores; (b) – Meio de cultivo suplementado com 5 μ M de KIN; (c) – BAP; (d) – TDZ.

Nota: Comprimento de barras de 1 cm.

4.1.3 Avaliação da morfogênese em explantes obtidos *in vitro*

O cultivo de explantes foliares provenientes de plantas regeneradas em meio MSØ, propiciou o desenvolvimento de diferentes tecidos e órgãos, quando cultivados em meio MS líquido na presença de 5 μ M de fitorreguladores (Tabela 3). Em meio MS na ausência de fitorreguladores, as gemas presentes em explantes foliares mostraram-se competentes na regeneração de plantas completas em meio líquido (Figura 9a). No entanto, raízes obtidas de plantas regeneradas *in vitro* não apresentaram resposta proliferativa no cultivo em meio líquido na ausência de fitorreguladores.

Com relação ao cultivo na presença de auxinas, a regeneração de plantas a partir de explantes foliares foi observada apenas no cultivo com 5 μ M de AIB, estimulando rápida proliferação (Figura 9b).

A desdiferenciação tecidual observada a partir de explantes foliares e posterior proliferação de células, formando culturas de células em suspensão (CCS) foi observada no meio contendo PIC ou 2,4-D (Figuras 9c e 9d). A auxina PIC foi efetiva no desenvolvimento de CCS da espécie, as quais puderam ser subcultivadas com inóculos de 1 grama de células, garantindo a manutenção do seu crescimento em meio líquido ou meio sólido (Figura 9e) e gerando calos da espécie.

Apesar do estímulo à proliferação celular, as CCS obtidas com 2,4-D apresentaram biomassa três vezes menor em comparação às obtidas com PIC (Tabela 3). Com relação ao cultivo com ANA, não houve a produção de CCS, apenas o estímulo ao início do processo de desdiferenciação celular, porém de modo incompleto e insignificante.

O cultivo de raízes na presença de AIB mostrou-se eficiente na proliferação homogênea *in vitro*, apresentando crescimento e aumento do número de raízes (Figura 9f). A proliferação de raízes também foi observada no cultivo de explantes radiculares em meio suplementado com ANA ou 2,4-D (Figuras 9g e 9h). No entanto, esta proliferação mostrou-se pouco significativa quantitativamente, apresentando diversos pontos de desenvolvimento de calos no tecido. Assim como no meio ausente de fitorreguladores, os explantes radiculares não apresentaram resposta morfogênica na presença de PIC em cultivo.

As citocininas foram capazes de estimular o desenvolvimento de gemas pré-existent nas folhas para o desenvolvimento de plantas *in vitro*. No entanto, em comparação ao cultivo obtido em MSØ (Figura 10a) ou AIB, as biomassas obtidas por frasco de cultivo em meio contendo BAP, KIN ou TDZ (Figuras 10b, 10c e 10d) não revelaram diferença estatística (Tabela 3). Os explantes radiculares cultivados na presença destas citocininas não apresentaram resposta morfogênica ou proliferativa nas condições analisadas.

Tabela 3 - Respostas morfológicas em meio MS líquido a partir de explantes de *Kalanchoe pinnata* cultivados por 60 dias na presença de 5µM de fitorreguladores.

Tratamento	Explante	Respostas (Peso seco em grama)		
		Planta	CCS	CR
MSØ	Folhas	0,396 ± 0,03*	-	-
	Raízes	-	-	-
ANA	Folhas	-	NS	-
	Raízes	-	-	NS
AIB	Folhas	0,362 ± 0,118*	-	-
	Raízes	-	-	0,397 ± 0,001
PIC	Folhas	-	0,606 ± 0,026*	-
	Raízes	-	-	-
2,4-D	Folhas	-	0,175 ± 0,057	-
	Raízes	-	-	NS
BAP	Folhas	0,415 ± 0,032*	-	-
	Raízes	-	-	-
KIN	Folhas	0,444 ± 0,053*	-	-
	Raízes	-	-	-
TDZ	Folhas	0,417 ± 0,029*	-	-
	Raízes	-	-	-

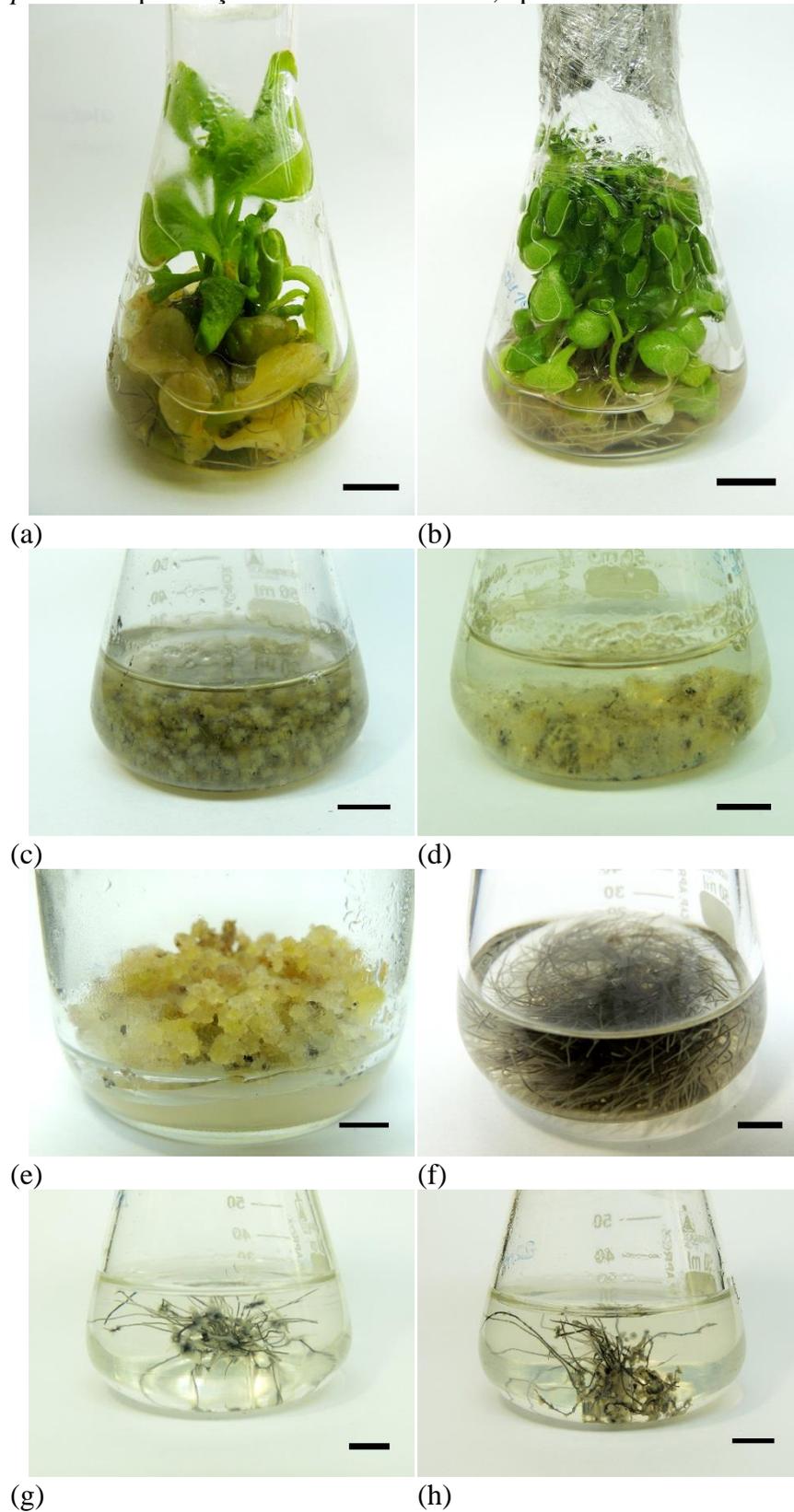
Legenda 1: CCS – cultura de células em suspensão; CR – cultura de raízes *in vitro*; NS – crescimento não significativo em relação ao inóculo inicial.

Nota 1: Em cada coluna, valores marcados com (*) não diferem estatisticamente entre si ($p > 0.05$).

Nota 2: Valores representam média ± desvio padrão por erlenmeyer, sendo previamente inoculados 3 explantes foliares ou 0,5 g de raízes por frasco.

Nota 3: Para os explantes responsivos ao tratamento hormonal, a resposta foi de 100% de indução morfológica. As respostas não observadas estão marcadas com um traço (-).

Figura 9 – Respostas morfogênicas de explantes excisados de plantas *in vitro* de *Kalanchoe pinnata* na presença de diferentes auxinas, após 60 dias de cultivo.



Legenda: (a) – Cultivo em MSØ; (b) - com 5 µM de AIB; (c)- PIC; (d) - 2,4-D; (e) - cultivo de calos em 5 µM de PIC; (f) – Cultivo de raízes em 5 µM de AIB; (g) – ANA; (h) 2,4-D.

Nota: Comprimento de barras de 1 cm.

Figura 10 – Respostas morfológicas de explantes foliares excisados de plantas *in vitro* de *Kalanchoe pinnata* em relação à presença de diferentes citocininas, após 60 dias de cultivo em meio líquido.



(a)

(b)



(c)

(d)

Legenda: (a) - Cultivo de plantas meio MS ausente de fitorreguladores; (b) - Cultivo em meio suplementado com 5 μ M de BAP; (c) - KIN; (d) - TDZ.

Nota: Comprimento de barras de 1 cm.

4.2 Análise fitoquímica

A análise fitoquímica preliminar dos extratos de *K pinnata* revelou a possível presença de saponinas e taninos em extratos metanólicos de folhas, caules e raízes de plantas cultivadas *in vivo*. A possível presença de flavonoides foi observada em folhas e caules, não sendo constatada em extratos metanólicos de raízes. Não foram observados alcaloides e fenóis nestes três extratos (Tabela 4).

O extrato aquoso de folhas obtidas *in vivo*, de coloração inicial lilás, indicou presença de flavonoides, saponinas, fenóis e taninos, exceto alcaloides (Tabela 4). A presença de fenóis neste extrato difere do resultado obtido para o mesmo material em extração metanólica, que apresentou coloração inicial verde sem reação positiva para essas substâncias.

A parte aérea de plantas obtidas em meio MS sem fitorreguladores apresentou resultado positivo apenas para a análise de flavonoides, tanto para extratos metanólicos quanto aquosos. Após a fase de aclimatização, os extratos aquosos de folhas apresentaram reação positiva apenas para flavonoides, mantendo o perfil fitoquímico do cultivo *in vitro*.

De modo similar, o extrato metanólico de cultura de células em suspensão, obtida pelo cultivo de folhas em meio MS líquido suplementado com PIC, mostrou reação positiva apenas para flavonoides. Para as culturas de raízes *in vitro* em meio MS suplementado com AIB, foi observada reação positiva para a presença de flavonoides e saponinas (Tabela 4).

Tabela 4 – Análise do perfil fitoquímico de extratos metanólicos e aquosos de diferentes materiais de *K. pinnata* obtidos *in vivo* e *in vitro*.

	Extratos	Flavonoides ¹	Alcaloides ²	Saponinas ³	Fenóis ⁴	Taninos ⁴
Metanólicos	Folha	+	-	+	-	+
	Caule	+	-	+	-	+
	Raiz	-	-	+	-	+
	Parte aérea <i>in vitro</i>	+	-	-	-	-
	Cultura de raízes <i>in vitro</i>	+	-	+	-	-
	CCS	+	-	-	-	-
Aquosos	Folha <i>in vivo</i>	+	-	+	+	+
	Parte aérea <i>in vitro</i>	+	-	-	-	-
	Folhas aclimatizadas	+	-	-	-	-

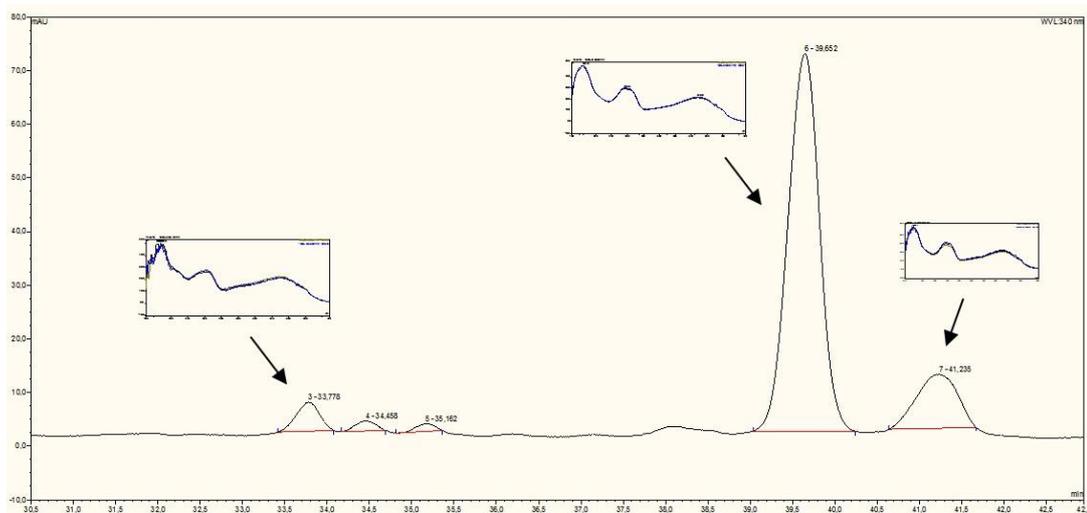
Legenda: + = presença da substância química; - = ausência da substância química; ¹ Teste para flavonas, flavonóis e xantonas; ² Testes com reativo de Meyer e Bouchardat; ³ Teste para saponinas espumílicas; ⁴ Teste com solução alcoólica de percloroato férrico.

A análise por CLAE-UV-DAD revelou a presença de flavonoides ligados a açúcares majoritariamente nos extratos de folha (Figura 11a) e planta regenerada *in vitro* (Figura 11b). Estas duas amostras apresentaram perfis fitoquímicos semelhantes quando analisados seus sinais em UV em 340 nm.

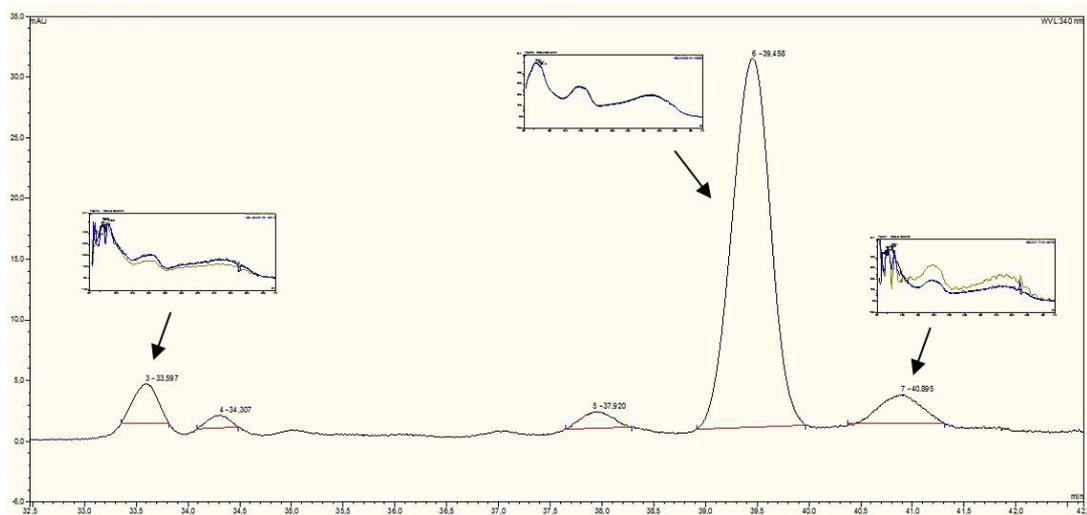
O sinal majoritário das amostras foi revelado no tempo de retenção (TR) em torno de 39 minutos. Os outros dois sinais mais relevantes da amostra foram observados nos tempos em torno de 33 e 41 minutos. Além destes, três sinais menores foram identificados em ambas as amostras nos tempos em torno de 34, 35 e 37 minutos. O sinal em 35 minutos apresenta-se mais perceptível no extrato de folhas cultivadas *in vivo*, enquanto que o sinal revelado em 37 minutos é mais perceptível no extrato de material cultivado *in vitro*.

O padrão das curvas de cada sinal observado em ultravioleta indica a possível presença de flavonoides em ambas as amostras. Para os demais extratos de material *in vivo* (caule e raízes) e *in vitro* (cultura de células em suspensão e cultura de raízes) analisados, não foram observados sinais e padrões indicativos da presença de flavonoides ligados a açúcares para a condição analisada (dados não mostrados).

Figura 11 – Cromatograma de análise de flavonoides em extratos de *Kalanchoe pinnata* pelo método de CLAE-UV-DAD a 340 nm.



(a)



(b)

Legenda: (a) - Extratos metanólicos de folhas obtidas *in vivo*; (b) - parte aérea de planta cultivada *in vitro* em meio MS na ausência de fitorreguladores.

A análise em CLAE-UV-IES-EM, no comprimento de onda de 254 nm, revelou a presença de diferentes compostos nos extratos analisados, sendo observados seis sinais em extratos metanólicos de folhas cultivadas *in vivo*, parte aérea cultivada em meio MS sem

fitorreguladores, culturas de células em suspensão e culturas de raízes. Foram revelados também 13 sinais em extratos metanólicos de caule e 14 sinais em extratos aquosos de folhas cultivadas *in vivo*.

Para esta análise, não foram observados sinais para o extrato metanólico de raízes cultivadas *in vivo* e extratos aquosos de parte aérea cultivada em meio MS sem fitorreguladores e folhas de plantas aclimatizadas.

A partir do cálculo de intensidade relativa, tendo como base a relação massa/carga (m/z), foram observadas sete substâncias comuns aos diferentes extratos para determinados tempos de retenção (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise de massas (m/z) para sinais em tempos de retenção em comum obtidos por CLAE-UV-IES-EM a 240 nm para diferentes extratos de *Kalanchoe pinnata* cultivada *in vivo* e *in vitro*.

TR (min)	Folha	Caule	Raiz	PA	CCS	CR	FA
39,2	579.2	-	-	579.2	-	-	-
39,8	579.2	-	-	579.2	-	-	-
42,1	563.2	-	-	563.2	-	-	563.1
44,8	421.3	-	-	421.3	-	-	481.2
101,1	399.3	399.3	-	399.3	399.3	-	-
107,6	369.3	369.3	-	369.3	369.3	369.3	-
114	339.3	339.3	-	-	339.3	339.3	-

Legenda: (TR) - Tempo de retenção para extratos metanólicos de folhas, caules, raízes, parte aérea cultivada *in vitro* (PA), cultura de células em suspensão (CCS), cultura de raízes (CR) e extrato aquoso de folhas (FA).

4.3 Citotoxicidade de extratos de *K. pinnata*

As substâncias quercetina e rutina não apresentaram toxicidade ao cultivo das diferentes linhagens celulares avaliadas, assim como o metanol na concentração de 5%, que representa valor acima do máximo de resíduo presente nos extratos (Figura 12).

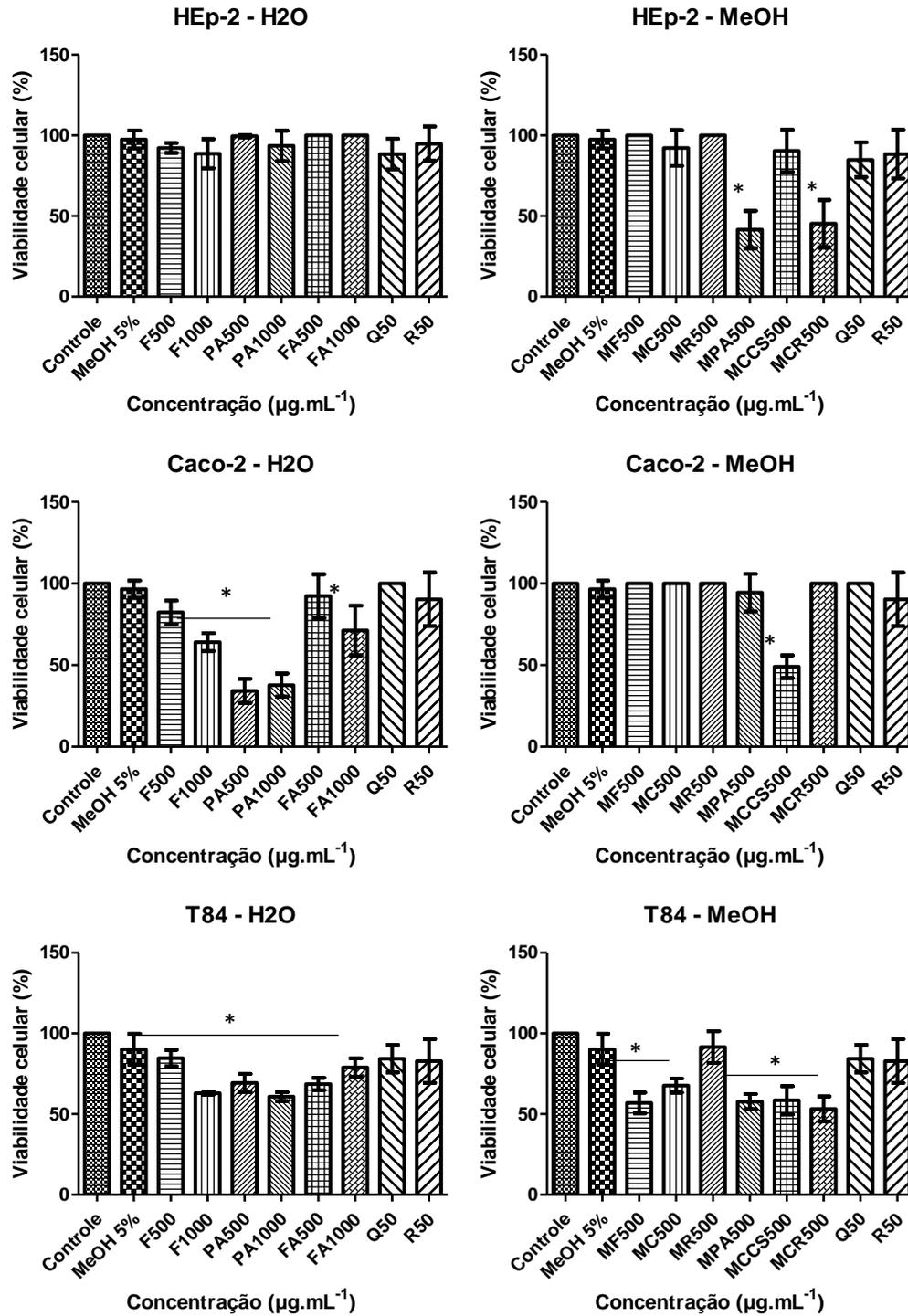
Nenhum dos extratos aquosos apresentou toxidez no cultivo celular da linhagem HEp-2. Para os extratos metanólicos, a parte aérea cultivada *in vitro* e a cultura de raízes mostraram toxidez significativa, reduzindo a viabilidade celular em torno de 50% em relação ao controle avaliado (Figura 12).

As linhagens Caco-2 e T84 mostraram-se mais sensíveis ao cultivo na presença de extratos aquosos da espécie. Os extratos de folhas cultivadas *in vivo*, folhas de plantas aclimatizadas e parte aérea da planta cultivada *in vitro*, em sua maior concentração

(1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), mostraram-se tóxicos a Caco-2. Para a linhagem T84, estes extratos apresentaram toxidez tanto em 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ quanto em 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (Figura 12).

Os extratos metanólicos não apresentaram redução da viabilidade celular ao cultivo de Caco-2, com exceção do extrato de culturas de células em suspensão, reduzindo a viabilidade em torno de 50%. Para a linhagem T84, apenas o extrato metanólico de raízes cultivadas *in vivo* não apresentou toxidez (Figura 12).

Figura 12 - Citotoxicidade de extratos aquosos (H₂O), metanólicos (MeOH) e de substâncias ocorrentes em *Kalanchoe pinnata* após 24 horas de cultivo a 37°C e 5% CO₂.



Legenda: F: Folhas de plantas cultivadas *in vivo*; PA: Parte Aérea cultivada *in vitro*; FA: Folhas de plantas aclimatizadas; Q: Quercetina; R: Rutina; MF: Folhas de plantas cultivadas *in vivo*; MC: Caule de plantas cultivadas *in vivo*; MR: Raízes de plantas cultivadas *in vivo*; MPA: Parte Aérea cultivada *in vitro*; MCCS: Cultura de células em suspensão; MCR: Cultura de raízes *in vitro*. * = Difere estatisticamente ao teste de Dunnett (P < 0,05).

4.4 Avaliação do potencial antibacteriano

Os extratos aquosos de *K. pinnata* apresentaram reduzida atividade antibacteriana, não sendo capazes de inibir o crescimento de nenhuma das cepas analisadas. No entanto, foram observadas reduções no crescimento de *C. freundii*, *B. thuringiensis*, *S. sonnei* e *E. coli* K-12 (HB 101) na presença do extrato aquoso de folhas cultivadas *in vivo* (Tabela 6). O extrato aquoso de parte aérea de planta cultivada em meio MS ausente de fitorreguladores não interferiu no crescimento das cepas. Porém, o extrato aquoso de folhas de plantas aclimatizadas, levou à redução do crescimento de *S. simulans* (Tabela 6).

Apesar de não inibir o crescimento de *Pseudomonas aeruginosa*, os extratos aquosos e a quercetina estimularam a produção de pigmento de cor amarela na colônia formada (Figuras 13b e 13c). Esta coloração não foi observada no controle, contendo apenas meio Mueller-Hinton Agar (Figura 13a) ou suplementado com metanol nas concentrações avaliadas e no cultivo com rutina nas concentrações testadas.

Na concentração de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ a rutina foi capaz de reduzir o crescimento de *P. aeruginosa* e *C. freundii*. Já a quercetina em mesma concentração reduziu o crescimento *P. aeruginosa*, *C. freundii*, *E. coli* (17-2), *S. marcescens* e *B. thuringiensis*. Quando a concentração destas substâncias foi elevada para $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ em cultivo, a rutina foi capaz de reduzir o crescimento de todas as cepas com exceção de *E. faecalis*, ao passo que a quercetina inibiu o crescimento de todas as cepas analisadas (Figura 13d) (Tabela 6).

Em *S. marcescens* cultivada na presença de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de rutina foi observado baixo crescimento e ausência de pigmentação da colônia. Para esta mesma cepa, foi observada a redução da intensidade de coloração do pigmento quando em cultivo na presença de $10 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de quercetina (Figura 13c).

Os controles utilizando metanol estavam relacionados à concentração final deste solvente na placa contendo quercetina ou rutina, devido ao fato destas substâncias serem solúveis apenas nesta condição. Na concentração de 10%, o metanol em cultura mostrou influência no crescimento das cepas de *P. aeruginosa*, *C. freundii*, *E. coli* (17-2), *E. coli* (ATCC 25922) e *S. aureus*. Sendo assim, os resultados de redução ou inibição do crescimento destas cepas na presença de $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de rutina e quercetina não puderam ser considerados. De modo contrário, como 10% de metanol em cultivo não apresentou influência no crescimento das demais cepas, para estas, os resultados puderam ser validados.

Tabela 6 - Crescimento bacteriano na presença dos flavonoides quercetina e rutina e de extratos aquosos e metanólicos ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) de *Kalanchoe pinnata* obtida *in vivo* e *in vitro*.

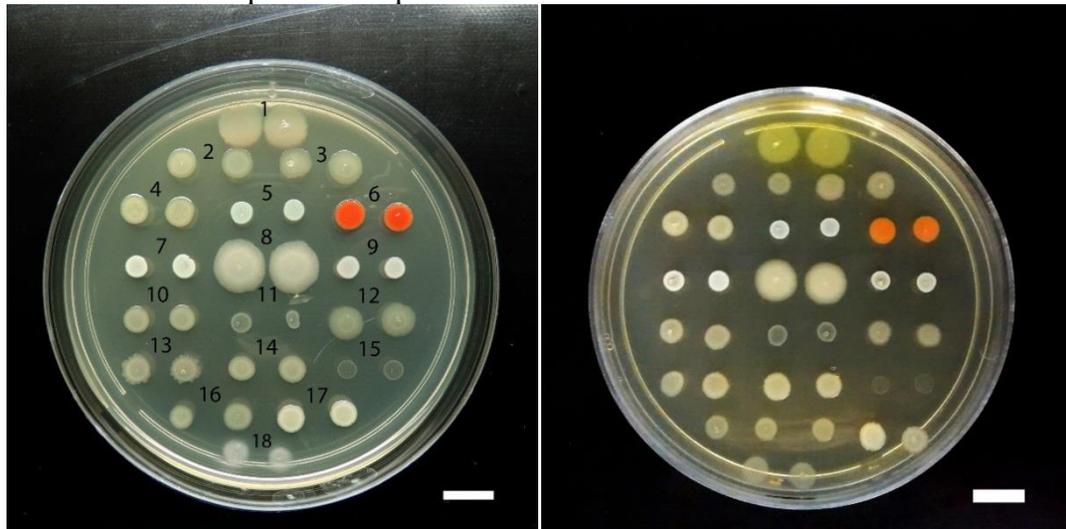
Cepas	F	C	RZ	PA	CCS	RIV	AF	APA	AFA	Q	RU	MeOH	RU	Q	MeOH
	1000	1000	1000	1000	500	500	1000	1000	1000	10	10	1%	100	100	10%
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	-	-	R	R	-	R	I	R
<i>C. freundii</i> (ATCC 12241)	R	R	R	-	A	A	R	-	-	R	R	-	R	I	R
<i>E. coli</i> enteroagregativa (17-2)	A	A	R	-	A	A	-	-	-	R	-	-	R	I	R
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	R	R	R	-	A	A	-	-	-	-	-	-	R	I	R
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	R	-	A	-	A	A	-	-	-	-	-	-	R	I	R
<i>S. marcescens</i> (7145)	R	-	R	-	A	A	-	-	-	R	-	-	R	I	-
<i>S. simulans</i> (ATCC 27851)	R	R	R	-	A	A	-	-	R	-	-	-	R	I	-
<i>B. thuringiensis</i> (ATCC 33679)	R	R	R	-	A	A	R	-	-	R	-	-	R	I	-
<i>S. saprophyticus</i> (ATCC 15305)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	-	-	-	-	-	R	I	-
<i>S. entericaserovar</i> Typhimurium (C20)	-	-	R	-	A	A	-	-	-	-	-	-	R	I	-
<i>E. faecalis</i> (29212)	-	-	R	-	A	A	-	-	-	-	-	-	-	I	-
<i>E. coli</i> K-12 (C600)	-	R	R	-	A	A	-	-	-	-	-	-	R	I	-
<i>S. sonnei</i> (ATCC 25931)	-	R	R	-	A	A	R	-	-	-	-	-	R	I	-
<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	R	-	R	-	A	A	-	-	-	-	-	-	R	I	-
<i>S. pyogenes</i> (8668)	-	-	I	-	A	A	-	-	-	-	-	-	I	I	-
<i>E. coli</i> K-12 (HB 101)	R	-	R	-	A	A	R	-	-	-	-	-	R	I	-
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603)	NT	NT	NT	NT	NT	NT	-	-	-	-	-	-	R	I	-
<i>E. coli</i> enteroagregativa (042)	R	R	R	-	A	A	-	-	-	-	-	-	R	I	-

Legenda: **Extratos metanólicos** – F: folhas; C: caule; RZ: raízes; PA: parte aérea cultivada *in vitro*; CCS: cultura de células em suspensão; RIV: raízes cultivadas *in vitro*.

Extratos aquosos - AF: folhas de planta cultivada *in vivo*; APA: Parte aérea cultivada *in vitro*; AFA: Folha de planta aclimatizada. **Flavonoides** - RU: Rutina; Q: Quercetina. A = aumento; R = redução I = inibição; NT = não testado; Traço (-) = crescimento similar ao controle em MHA.

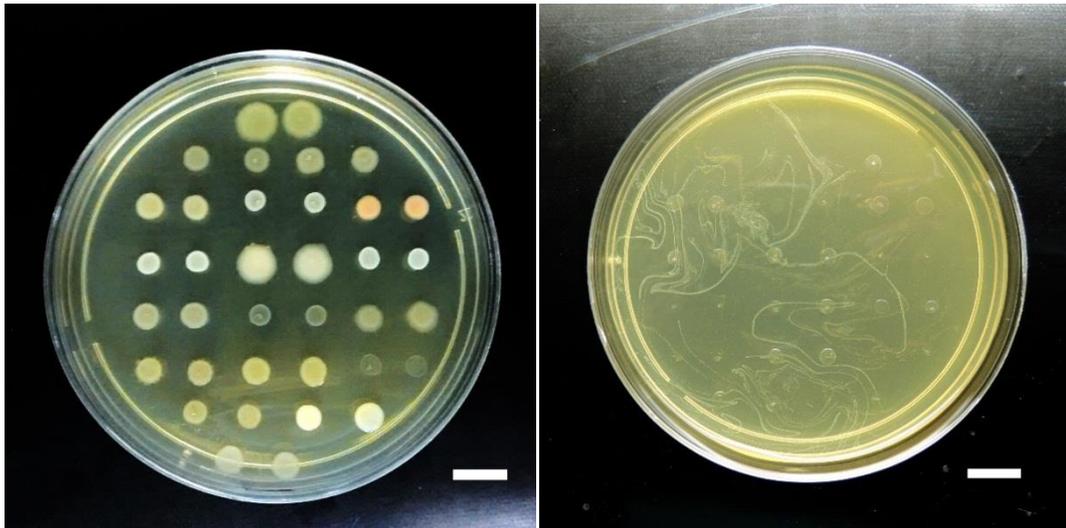
Nota: Dados grifados em vermelho não puderam ser validados devido à influência do solvente no controle (MeOH 10%).

Figura 13 – Atividade antibacteriana de extrato aquoso de folhas de *Kalanchoe pinnata* e do flavonoidequercetina após 24h de cultivo a 37°C.



(a)

(b)



(c)

(d)

Legenda: (a) - Cepas cultivadas em meio MHA; (b) cultivo na presença de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de extrato aquoso de folhas *in vivo*; (c) – de quercetina na concentração de 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$; (d) – e de quercetina na concentração de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. 1 - *P. aeruginosa* (ATCC 27853); 2 - *C. freundii* (ATCC 12241); 3 - *E. coli* enteroagregativa (17-2); 4 - *E. coli* (ATCC 25922); 5 - *S. aureus* (ATCC 25923); 6 - *S. marcescens* (7145); 7 - *S. simulans* (ATCC 27851); 8 - *B. thuringiensis* (ATCC 33679); 9 - *S. saprophyticus* (ATCC 15305); 10 - *S. enterica* serovar Typhimurium (C20); 11 - *E. faecalis* (29212); 12 - *E. coli* K-12 (C600); 13 - *S. sonnei* (ATCC 25931); 14 - *E. coli* (ATCC 35218); 15 - *S. pyogenes* (8668); 16 - *E. coli* K-12 (HB 101); 17 - *K. pneumoniae* (ATCC 700603); 18 - *E. coli* enteroagregativa (042).

Nota: Comprimento de barras de 1 cm.

Ao contrário da atividade de extratos aquosos, os extratos metanólicos da planta cultivada *in vivo* apresentaram notada atividade antibacteriana. Foram observadas reduções no crescimento de nove cepas em extratos metanólicos de folha, sete cepas em extrato metanólico de caule e 13 cepas em extrato metanólico de raízes, sendo este último efetivo na inibição do crescimento de *S. pyogenes* na concentração de 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Para os extratos metanólicos de

parte aérea de planta cultivada *in vitro*, culturas de células em suspensão e cultura de raízes, não foi observada atividade de redução ou inibição do crescimento bacteriano (Tabela 6).

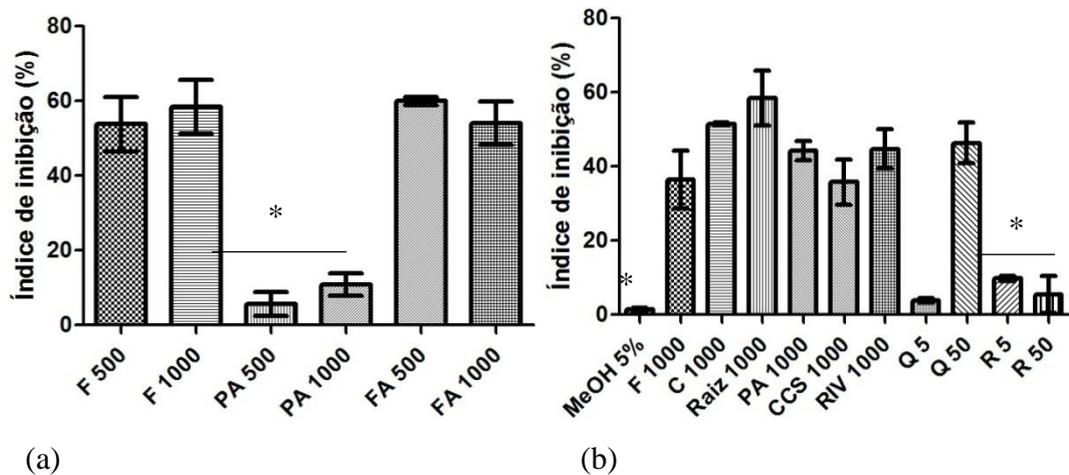
4.5 Avaliação da atividade antibiofilme

A formação de biofilmes de *E. coli* enteroagregativa (EAEC 042) mostrou-se alterada quando em cultivo na presença dos extratos aquosos de *K. pinnata* e de quercetina (Figura 14a). Apesar de não expressar inibição do crescimento desta cepa no ensaio de macrodiluição, os extratos aquosos de folhas da planta cultivada *in vivo* foram capazes de reduzir a formação de biofilme de EAEC 042 a valores acima de 50%. Tal redução também foi observada na presença de extratos aquosos de folhas de plantas aclimatizadas. Ambos os extratos apresentaram inibição do crescimento nas concentrações de 500 ou 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 14a).

Apesar do resultado positivo para os extratos aquosos de folha *in vivo* e de planta aclimatizada, os extratos aquosos de parte aérea de planta cultivada *in vitro* não foram capazes de apresentar redução significativa na formação de biofilme. A ausência de inibição também foi observada no cultivo bacteriano na presença de rutina nas concentrações de 5 ou 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e na presença de quercetina em 5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Figura 14b).

No entanto, na maior concentração testada (50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), a quercetina foi capaz de reduzir a formação de biofilme em uma taxa próxima a 50%, assim como os extratos aquosos de folhas de plantas *in vivo* e aclimatizadas.

Figura 14 – Formação de biofilmes de EAEC (042) após 18h de cultivo a 37°C na presença de extratos aquosos, metanólicos e substâncias ocorrentes em *Kalanchoe pinnata* ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) cultivada *in vivo* e *in vitro*.



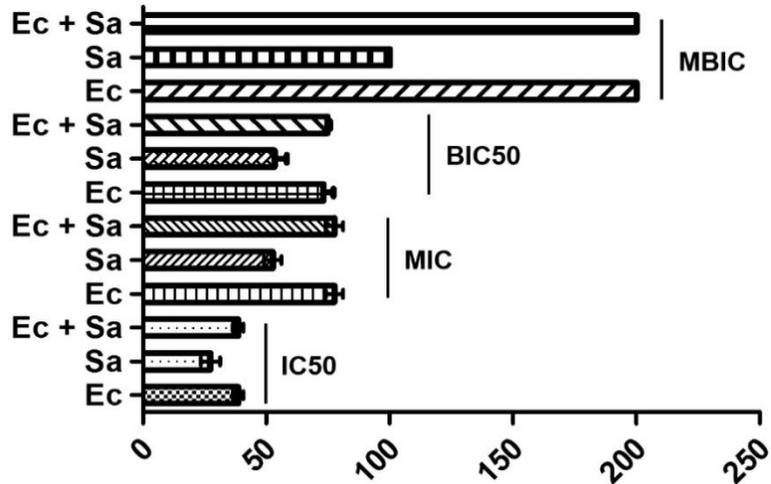
Legenda: (a) – Extratos aquosos; (b) – Extratos metanólicos e flavonoides. **F**: Folha de planta cultivada *in vivo*; **C**: caule cultivado *in vivo*; **PA**: Parte aérea de planta cultivada *in vitro*; **FA**: Folha de planta aclimatizada; **CCS**: cultura de células em suspensão; **RIV**: Raiz de planta cultivada *in vitro*; **Q**: quercetina; **R**: rutina; * Valores não diferem estatisticamente do controle ao teste de Dunnet ($P < 0,05$).

Os extratos metanólicos de *K. pinnata* demonstraram influência sobre a formação de biofilmes de EAEC 042. A maior atividade inibitória foi observada em extrato metanólicos de raízes da espécie, em concentração de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$, com índice de inibição em torno de 60%. Nesta mesma concentração, extratos de folhas, parte aérea cultivada *in vitro*, cultura de células em suspensão e cultura de raízes demonstraram atividade inibitória próxima a 40%. Para o extrato metanólico de caule, o índice de inibição foi de aproximadamente 50% (Figura 14b).

Os biofilmes e o crescimento bacteriano de EAEC 042 e *S. aureus* individualmente ou em mistura foram avaliados na presença de diferentes concentrações de quercetina pura (Figura 15). EAEC 042 se mostrou menos sensível à presença de quercetina para o crescimento bacteriano e estabelecimento de biofilme quando comparado à *S. aureus*. Quando as duas cepas foram avaliadas em mistura, foi observado que há a tendência a concentração efetiva de quercetina para inibição do biofilme na mistura se igualar à concentração efetiva para inibição de biofilme de EAEC 042 avaliada isoladamente.

A concentração de quercetina requerida para as aferições feitas para os biofilmes representam o dobro das concentrações necessárias para inibição do crescimento bacteriano. Para *S. aureus*, a IC 50 e a MIC estão em torno de 27 e $52 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de quercetina, respectivamente. Para ambos, EAEC 042 e a mistura das cepas, os valores de IC50 e MIC são próximos a 38 e $77 \mu\text{g.mL}^{-1}$, respectivamente (Figura 15).

Figura 15 – Avaliação do potencial antibiofilme da quercetina ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) sobre EAEC 042 e *S. aureus* cultivados isoladamente ou em mistura.



Legenda: Ec – *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC 042); Sa – *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923); MBIC – mínima concentração inibitória para formação de biofilme; BIC50 – concentração inibitória à formação de 50% de biofilme; MIC – mínima concentração inibitória ao crescimento bacteriano; IC50 – concentração inibitória ao crescimento bacteriano em 50%.

Quanto à avaliação da formação de biofilmes, *S. aureus* apresenta BIC50 em $53 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e MBIC em $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de quercetina. Para EAEC 042 e biofilme misto das duas cepas, o valor médio de BIC50 é de $74 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e de MBIC de $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, o dobro da concentração de quercetina necessária para mesmo efeito em biofilme de *S. aureus* isoladamente (Figura 15).

Os resultados relativos às atividades citotóxica, antibacteriana e antibiofilme de extrato aquoso de folhas, quercetina e rutina estão reunidos no artigo “Cytotoxic, antibacterial and antibiofilm activities of aqueous extract of leaves and flavonoids occurring in *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.”, publicado no periódico “Journal of Medicinal Plants Research”, conforme **Apêndice A** do presente trabalho.

5 DISCUSSÃO

O protocolo estabelecido para descontaminação das folhas obtidas de plantas cultivadas *in vivo* mostrou-se eficiente. Apesar de a espécie apresentar folhas de consistência crassa, o hipoclorito de sódio (NaClO) a 2% foi suficiente para descontaminação e garantia da manutenção da viabilidade dos tecidos, permitindo o desenvolvimento de plantas saudáveis em meio MS. Além do NaClO, a lavagem com solução de etanol 70% também pode ser utilizada para garantir a limpeza de *K. pinnata* cultivada em condições naturais, sempre seguida de lavagens com água destilada estéril para remoção dos agentes desinfestantes (LEAL-COSTA et al., 2010).

O uso de detergente comercial também foi favorável à descontaminação foliar. Soluções à base de cloro, tais como o hipoclorito de sódio, possuem ação germicida e são amplamente utilizadas para descontaminação de explantes. A associação destas soluções com detergentes e surfactantes, como o Tween 80 por exemplo, melhora o contato das substâncias descontaminantes com os tecidos vegetais, uma vez que elimina a tensão superficial do material, elevando a taxa de descontaminação (GRATTAPAGLIA; MACHADO, 1998).

A propagação *in vitro* de *K. pinnata* a partir de gemas foliares foi alcançada com sucesso a partir do cultivo em meio MS. Este meio de cultura é conhecido por ser uma das formulações mais completas para as respostas *in vitro* e mostrou conter os nutrientes necessários para o desenvolvimento dessas gemas formando plantas completas e competentes à aclimatização, como já observado em outros trabalhos com a espécie (LEAL-COSTA et al., 2010; MUZITANO et al., 2011).

Além dos constituintes do meio de cultura, o cultivo *in vitro* é realizado sob condições controladas de fatores físicos e químicos. No caso de fatores físicos, a luminosidade é uma condição que tem sido bastante investigada, por exemplo. A presença de luz é extremamente importante no controle da expressão dos genes BRANCHED1 (BCR1), que são relacionados à promoção de dormência em gemas. A exposição à luminosidade direta, com maior concentração de comprimento de onda vermelho em relação ao vermelho extremo, associada à excisão do explante, favorecem a repressão destes genes, promovendo o desenvolvimento de plantas (GONZÁLEZ-GRANDÍO; CUBAS, 2014).

Em relação aos fatores químicos, ou seja, substâncias que são suplementadas ao meio de cultura, a concentração de açúcares tem grande relevância no desenvolvimento de gemas. A adição de sacarose estimula a divisão de células meristemáticas das gemas, promovendo a progressão do ciclo celular diretamente ou por via indireta, a partir da redução da expressão de

BRC1. A concentração de açúcares exógenos nesta resposta *in vitro* mostra-se substancialmente mais relevante do que a concentração de auxinas endógenas, atuantes no bloqueio do desenvolvimento de gemas (MASON et al., 2014).

O cultivo em meio MS suplementado com sacarose mostrou-se o mais eficiente no desenvolvimento *in vitro* de gemas de *K. pinnata*. No entanto, a multiproliferação de brotos ou plantas a partir de gemas foliares necessita de mais estudos. No presente trabalho, todos os tratamentos a que estes explantes foram submetidos resultaram apenas na produção de uma planta por gema, demonstrando o forte padrão genético para a propagação vegetativa por esta via.

A concentração de 90 mM de sacarose pode ser considerada a mais propícia ao desenvolvimento *in vitro* de *K. pinnata*, por apresentar valores superiores ou que não diferem estatisticamente em todos os parâmetros avaliados. A sacarose tem sido o carboidrato de escolha na maioria dos estudos em culturas de tecidos vegetais. Sua concentração mais amplamente utilizada está em torno de 30 g.L⁻¹, ou 90 mM, sendo, no entanto, necessário o ajuste para cada espécie em estudo, visando à otimização da produção (SINGH;PATEL, 2014). O cultivo em meio de cultura contendo sacarose leva à alta taxa de síntese e acúmulo de substâncias vitais quando comparado a cultivos com sorbitol ou outros açúcares. Este fenômeno pode estar metabolicamente relacionado à maior taxa de regeneração e desenvolvimento *in vitro* em cultivo com sacarose (MELLO et al., 2001).

Embora a suplementação dos meios de cultura com açúcar seja considerada essencial para suprir a demanda energética vegetal, sendo uma variável nutricional no cultivo *in vitro*, a elevação da concentração de açúcares acima de um ponto ótimo pode levar a um estresse osmótico nas culturas, prejudicando o processo morfogênico (PAIVA NETO;OTONI, 2003). Apesar de muitas vezes não afetar diretamente na taxa de regeneração, o aumento da concentração de diferentes açúcares a valores superiores a 3% (aproximadamente 90 mM) pode levar à expressiva diminuição do número e comprimento de brotos e raízes em cultivos *in vitro* (GAUCHAN, 2012; PANATHULA et al., 2014). De modo contrário, concentração de açúcares em meio de cultura abaixo de 60 mM pode causar a hiperidricidade do cultivo, reduzindo a viabilidade e taxa de regeneração dos explantes (BAHMANI et al., 2009). Por apresentar o maior número médio de raízes e demais parâmetros equiparáveis em sua maioria com os obtidos no cultivo com sacarose, a dextrose em 120 mM pode ser considerada uma alternativa à sacarose no cultivo *in vitro* para regeneração de plantas da espécie.

Outro fator importante para o desenvolvimento *in vitro* é o uso de fitorreguladores. Sabe-se, por exemplo, que a adição de citocininas suplementadas no cultivo *in vitro* estimula

proliferação celular e a morfogênese, sobretudo em tecidos meristemáticos, propiciando o desenvolvimento de gemas e brotos (ZABALAK et al., 2012).

Neste trabalho, de modo geral, as citocininas não forneceram estímulo para a morfogênese em explantes foliares da região da nervura mediana. No entanto, todas as citocininas testadas apresentaram potencial para o desenvolvimento de gemas foliares em plantas, tanto em meio sólido quanto líquido. Alguns autores indicam que diferentes concentrações e combinações com as citocininas TDZ e BAP podem induzir alta taxa de regeneração de plantas por gemas, porém, não sendo eficientes na multiproliferação, gerando apenas um broto por gema pré-existente (NAZ et al., 2009).

O cultivo *in vitro* com auxinas, ao contrário das citocininas, não se mostrou homogêneo em termos de resposta morfogenética. No presente trabalho, foram observadas respostas morfogênicas diferenciadas em explantes de gemas e de nervuras. Os cultivos de gemas foliares com as auxinas AIB ou ANA auxiliaram no desenvolvimento de plantas *in vitro* da espécie. Este efeito também foi observado nos estudos *in vitro* com *Kalanchoetomentosa*, onde o cultivo na presença de ANA isoladamente ou em combinação com BAP pode induzir o rápido desenvolvimento de brotos por organogênese direta a partir de ápices caulinares (KHAN et al., 2006). No entanto, o cultivo de explantes foliares na presença de altas concentrações de fitorreguladores, como 10 μM de ANA associado a concentrações de TDZ ou BAP pode reduzir a frequência de regeneração, como observado em *K. pinnata* e *K. daigremontiana* (NAZ et al., 2009).

Para os ensaios avaliando a atividade das auxinas PIC e 2,4-D, prevaleceu a formação de calos a partir dos explantes foliares. Em estudo de *K. pinnata* com 2,4-D, realizado por Santos e colaboradores (2014) a concentração em torno de 5 μM mostra-se como a melhor para o desenvolvimento de calos, podendo concentrações elevadas levarem à toxicidade no cultivo. Quando cultivados na ausência de luz, a formação de calos pode ser otimizada com a associação de BAP. Porém, o cultivo destes explantes foliares em meio sólido não induz a 100% de diferenciação dos explantes (SANTOS et al., 2014). O cultivo em 2,4-D estimula a produção de calos friáveis em *K. pinnata*, que podem ser utilizados em estudos de culturas de células em suspensão, ao passo que a adição de BAP ao cultivo aumenta o grau de compactação destes calos (MIZONOBÉ, 2001).

Uma vez estabelecido o material *in vitro*, a avaliação fitoquímica do mesmo se fez importante para o avanço nos estudos antibacterianos da espécie, iniciando-se pela avaliação do material cultivado *in vivo* em condições ambientais naturais.

A concentração de metabólitos em folhas de *K. pinnata* está diretamente relacionada à qualidade e intensidade luminosa, havendo maior produção sob estímulo de luz azul e em maior intensidade. Deste modo, é possível que haja também maior concentração de metabólitos com atividade medicinal em extratos de folhascultivadas sob luminosidade natural em relação às mantidas em cultivo *in vitro* (CRUZ et al., 2012). A maior concentração de flavonoides quercetínicos em folhas da espécie também está diretamente relacionada a intensidade luminosa. O cultivo de *K. pinnata* sob incidência de luz solar direta no período do verão fornece rendimentos de flavonoides totais três vezes superior em relação a plantas cultivadas *in vitro* e duas vezes superior a plantas aclimatizadas (MUZITANO et al., 2011).

O metanol é o solvente de escolha para a maioria dos trabalhos com flavonoides da planta, devido à alta solubilidade de substâncias como quercetina e rutina, o que favorece a extração. Estudos aprofundados para identificação ou isolamento de flavonoides requerem investimento em particionamento do extrato metanólico, isolamento de cristais em cromatografia e identificação por espectrometria de massa com ressonância magnética nuclear (MEGAWATI;FAJRIAH, 2013).

Diversos métodos analíticos podem ser utilizados para quantificação de flavonoides, como cromatografia em camada fina, cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e espectrofotometria, podendo estes métodos serem comparados entre si. Deste modo são necessários esforços para o isolamento e a identificação inicial de substâncias padrão para quantificações e uso futuros (YOO et al., 2010).

Diferentes técnicas e métodos de análise, além do tipo de extração devem ser utilizados para uma melhor elucidação do perfil fitoquímico de espécies. Apesar de não terem sido observados flavonoides em extratos de raízes de *K. pinnata* no presente trabalho, Majaz e colaboradores (2011a) observaram flavonoides em extratos clorofórmicos de raízes da espécie em CLAE. Estes, no entanto, não foram observados em cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, técnica que apontou apenas a presença de esteroides. A avaliação fitoquímica preliminar de extrato clorofórmico de raízes revelou também o indicativo de presença de saponinas, alcaloides, glicosídeos e taninos (MAJAZ et al., 2011a).

No presente trabalho, a técnica de CLAE-UV-IES-EM para análise de massas pôde revelar a presença de sinais indicativos da presença de substâncias em comum para extratos de materiais obtidos *in vivo* e *in vitro*. Estes resultados podem ser comparados por outros métodos analíticos e futuramente avaliados para identificação de novas substâncias. Neste ponto, são necessários mais estudos para elucidação do perfil fitoquímico observado no material obtido *in vivo* e *in vitro*, visando também a utilização com fins medicinais da espécie.

Apesar de ser detectada similaridade de substâncias entre os materiais analisados, é possível inferir que há variação de metabólitos secundários entre os diferentes órgãos. Isto pode ser devido à necessidade de produção específica para diferentes tipos de estresse, como por exemplo, radiação, herbivoria ou infecções. Deste modo, alguns extratos podem mostrar-se mais ativos quando testados em determinadas atividades medicinais devido à presença de substâncias específicas ao órgão de ocorrência (OLIVOTO et al. 2017).

A atividade antibacteriana de *K. pinnata* tem sido reportada na literatura, podendo ser destacado o uso etnofarmacológico a partir do consumo da espécie na forma de chás e infusões (MAJAZ et al., 2011b). Sendo assim, a avaliação da toxidez de extratos aquosos mostra-se pertinente para a seguridade doseu aproveitamento para fins medicinais. As linhagens selecionadas para o presente estudo estão relacionadas a esta forma de consumo por via oral, sendo eleitas células de linhagens tumorais de laringe (HEp-2), cólon intestinal (Caco-2) e cólon retal (T84).

Com relação aos extratos aquosos avaliados, a linhagem HEp-2 mostrou-se resistente ao cultivo na presença desses, o que não foi observado para as demais linhagens. Para os extratos metanólicos, a linhagem T84 demonstrou maior sensibilidade ao cultivo na presença de extratos da espécie. Devido à ausência de um padrão de toxidez aos diferentes extratos, é proposto que características específicas a cada extrato influenciem na sensibilidade das diferentes linhagens, não podendo ser correlacionada a um grupo específico de metabólitos avaliados neste trabalho.

A análise fitoquímica realizada neste trabalho revelou a presença de flavonoides em todos os extratos avaliados, com exceção de raízes obtidas *in vivo*. Uma vez que não foi observada citotoxicidade a nenhuma linhagem para os compostos quercetina e rutina, a toxidez observada em alguns extratos não pode ser relacionada a flavonoides livres presentes na planta e nas culturas *in vitro*.

Compostos denominados bufadienolídeos estão caracteristicamente presentes em folhas e caules de *K pinnata* e outras espécies do gênero *Kalanchoe*, sendo apresentados como potenciais repelentes de insetos na planta (SUPRATMAN et al., 2000). Em ensaios *in vitro*, estas substâncias demonstram alta citotoxicidade em linhagens de carcinomas humanos, destacando-se os compostos Bryofilina A e Bryofilina B (MILAD et al., 2014). Este grupo de metabólitos pode ser considerado o principal nesta atividade para a espécie, possuindo potencial de quimioprevenção de câncer. (SUPRATMAN et al., 2001). A possível presença destes compostos nos extratos avaliados pode também estar relacionada a sensibilidade observada em algumas linhagens.

Os extratos aquosos de *K. pinnata* não mostraram atividade inibitória ao crescimento bacteriano, avaliado pelo bioensaio em macrodiluição, bem como extratos metanólicos de material cultivado *in vitro*. No entanto, extratos aquosos de folhas cultivadas *in vivo* apresentaram redução do crescimento de quatro cepas avaliadas. A atividade antibacteriana *in vitro* de extratos aquosos de folhas também foi observada em cepas de *Propionibacterium acnes* (KUMAR et al., 2013), *Alcaligenesfaecalis* e *Bacillus subtilis* (SHARMA et al., 2014).

Apesar do observado para extratos aquosos, extratos metanólicos da planta apresentam notada atividade antibacteriana. Em extratos de folhas de *K. pinnata* já foi observada também atividade antibacteriana em cepas como *Enterococcus faecalis* (AIBINU et al., 2007) *Escherichia coli* (PATTEWAR et al., 2013), *Klebsiella pneumoniae* (OKWU; NNAMDI, 2011b), *Pseudomonas aeruginosa* (TATSIMO et al., 2012), *Salmonella typhi* (NWADINIGWE, 2011), *Shigella dysenteriae* (AKINPELU, 2000), *Staphylococcus aureus* (BISWAS et al., 2011), entre outras.

Extratos metanólicos de raízes de *K. pinnata* mostram-se mais efetivos na atividade antibacteriana contra *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa* em relação aos extratos de raízes em éter de petróleo, clorofórmio ou aquoso, não sendo ativos, no entanto contra *Candida albicans* (MAJAZ et al., 2011c).

Para o caule da espécie, o extrato metanólico mostrou-se mais efetivo que o extrato aquoso contra o crescimento de *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *Salmonella enterica* serovar Typhi, *Alcaligenes faecalis*, *Bordetella bronchiseptica*, *Corynebacterium diptheriae*, *Micrococcus luteus* e *Serratia marcescens*, com valores próximos à gentamicina e ciprofloxacina, antibióticos de referência utilizados (NWADINIGWE, 2011; SHARMA et al., 2014).

No presente trabalho foram observadas as atividades de redução e inibição de *Serratia marcescens* apenas quando cultivada na presença de quercetina. Esta substância pode ser um dos princípios ativos presentes em extratos metanólicos da planta, uma vez que a quercetina demonstra alta solubilidade neste solvente (MEGAWATI; FAJRIAH, 2013).

A quercetina apresenta notada atividade antibacteriana em concentrações superiores a 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo capaz de inibir o crescimento de todas as cepas testadas neste trabalho. Além destas cepas, a quercetina apresenta atividade antibacteriana também às cepas de *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter baumannii*, *Helicobacter pylori* e também em *Staphylococcus aureus* Multirresistente (MRSA) quando avaliada sozinha ou em associação com oxacilina (RAMOS et al., 2006; OZÇELIK et al., 2006).

Também presente em extratos de *K. pinnata*, a rutina demonstrou atividade antibacteriana para todas as cepas avaliadas. Apesar da inibição do crescimento das cepas avaliadas observada no cultivo com $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de quercetina, a rutina mostrou-se capaz de conferir apenas a redução no crescimento das cepas avaliadas. Para cepas de *E. coli* e *S. aureus*, a mínima concentração inibitória de rutina apresenta-se em valores superiores a $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (ARARUNA et al., 2012).

Além dos flavonoides, a presença de saponinas, fenóis e taninos nos extratos de folhas cultivadas *in situ* extratos metanólicos da planta pode estar relacionada a atividade antibacteriana observada em relação aos demais extratos aquosos e metanólicos de materiais derivados de cultivo *in vitro*, que não apresentaram reação positiva para a presença destas substâncias.

A atividade antibacteriana de saponinas isoladas de extratos vegetais já foi demonstrada em cepas de *E. coli*, *B. subtilis* e outras, além da atividade antifúngica (EDEWOR et al., 2009; KANNABIRAN et al., 2009; MAATALAH et al., 2012). Do mesmo modo, taninos hidrolisados e taninos condensados de origem vegetal são ativos contra o crescimento de *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus* e *B. licheniformis*, *Shigellaboydii*, *S. flexneri* entre outros, além de leveduras e fungos (BANSO; ADEYEMO, 2007; LIM et al., 2006).

Em relação aos compostos fenólicos como ácidos fenólicos e cumarinas, a atividade antibacteriana foi observada em cepas de *E. coli* e *Bacillus cereus* entre outras e fungos (NOHYNEK et al., 2006; NITIEMA et al., 2012). O aumento e efetividade da atividade antibacteriana de derivados de ácidos fenólicos está geralmente relacionada ao aumento da cadeia alquílica na molécula do ácido, mostrando-se efetivas também as regiões butil éster (MERKL et al., 2010).

Algumas substâncias de origem vegetal possuem a capacidade de controlar o estabelecimento e crescimento de biofilmes bacterianos. Estas substâncias podem atuar em diferentes estágios da formação de biofilmes, como na adesão bacteriana, na motilidade e no *quorum-sensing*, tendo ainda a vantagem de possuírem menor probabilidade de resistência bacteriana (BORGES et al., 2013).

Dentre estes mecanismos, a adesão celular é um mecanismo chave na fisiopatologia de EAEC em casos de diarreias agudas. O padrão agregativo de aderência às células epiteliais e a formação de biofilme são fatores de virulência importantes para as EAEC (VILLASECA et al., 2005).

Apesar de não apresentarem inibição do crescimento de colônias de EAEC (042), os extratos aquosos de folhas de *K. pinnata* cultivadas *in vivo* e de folhas de plantas aclimatizadas,

além da quercetina e extratos metanólicos da planta e de material cultivado *in vitro* (parte aérea e cultura de raízes), foram capazes de inibir a formação de biofilmes em valores próximos ou superiores a 50%.

A redução de biofilmes pode estar relacionada à repressão de genes de curli e motilidade, resultando também na diminuição da produção de fímbrias, crescimento e dispersão. Compostos como a cumarina podem atuar em de *E. coli*O157:H7 (EHEC) também na repressão de genes produtores de toxina tipo shiga e virulência (LEE et al., 2014a).

Assim como observado para EAEC, a quercetina apresenta também atividade antibiofilme para *Staphylococcus aureus*, observada em ensaios *in vitro*. A quercetina presente em extratos é capaz de atuar na repressão de genes de adesão celular, além de reduzir a capacidade hemolítica de *S. aureus*, sendo sugerida para o uso na inibição da formação de biofilmes recalcitrantes (LEE et al., 2013).

Mesmo muitas vezes não atuando na inibição do crescimento bacteriano, extratos vegetais podem ser efetivos contra a formação de biofilmes de *S. aureus*. Para a cepa resistente a meticilina (MSRA) foi observada a inibição da formação de biofilmes por extratos de *Ginkgobiloba*, ainda que este extrato não tenha apresentado efeito sobre o crescimento bacteriano em cultivo *in vitro*. Este extrato também se mostrou efetivo na inibição do biofilme de EHEC em diferentes superfícies, impedindo a aderência em poliestreno, nylon e vidro (LEE et al., 2014b).

Bactérias formadoras de biofilmes são capazes de aderir em superfícies e formar esta estrutura, sem a necessidade de se associarem a outras espécies. No entanto, em ambientes naturais, os biofilmes podem ser formados por diferentes microorganismos. A exemplo de biofilmes orais, estes são formados pelo acúmulo de bactérias, como *Streptococcus mutans* e fungos, como *Candidaalbicans*. A natureza heterogênea de biofilmes pode proteger as células contra agentes antimicrobianos e a defesa do hospedeiro, podendo ocorrer múltiplos mecanismos de resistência antimicrobiana (ABDEL-AZIZ; AERON, 2014). Deste modo, faz-se importante a avaliação não só de biofilmes simples, com apenas um microorganismo aderido, mas de misturas, que contenham dois ou mais microorganismos.

No presente trabalho, as culturas de biofilme misto, com EAEC 042 e *S. aureus* obtiveram crescimento satisfatório nos controles testados. Para o cultivo na presença de quercetina foi observado em geral que EAEC 042 mostra-se mais resistente à ação inibitória desta substância quando comparado à *S. aureus*. Este padrão manteve-se nos biofilmes mistos, observando-se valores de crescimento dos biofilmes mistos próximos ao crescimento de EAEC 042 e

superiores à *S. aureus*. Isto sugere que a cepa mais resistente se mantenha persistente na mistura ou confira maior resistência ao biofilme como um todo.

Em outros trabalhos, é observado o aumento da resistência em biofilmes mistos. A associação de *E. coli*, *S. aureus*, *B. subtilis* e *P. aeruginosa* em crescimento foi avaliada na presença de extratos de espécies vegetais comerciais, observando-se que apesar do aumento de resistência das misturas, os extratos são capazes de inibir o estabelecimento de biofilmes (AGRAWAL, 2011).

Além de EAEC 042, a eficiência da quercetina na atividade antibiofilme já foi demonstrada em *E. Coli* O157:H7. Esta substância e outros flavonoides podem atuar como possíveis inibidores não específicos da comunicação célula a célula mediada por AI-2 (autoindutor-2), representante da família de moléculas sinalizadoras no *quorum-sensing* em biofilmes de *E. coli* (VIKRAM et al., 2010). Esta atividade da quercetina é relevante, considerando o fato de AI-2 estar envolvida também no desenvolvimento de biofilmes. A ligação entre AI-2 e LsrR (regulador gênico) é mediadora da arquitetura do biofilme e sua formação, pela coordenação de interações de genes relacionados a biofilmes, afetando as respostas fenotípicas (LI et al., 2007).

Além de AI-2, a quercetina e outras substâncias fitoquímicas podem atuar como antagonistas de lactonashomoserinas (outra classe de sinalizadores envolvidos no *quorum-sensing*), sendo responsáveis pela redução de forma dose-dependente de biofilmes de *E. coli* e *Vibrioharveyi* (BORGES et al., 2013).

O *quorum-sensing* possui papel vital na regulação dos fatores de virulência em muitos patógenos. Deste modo, a interrupção do *quorum-sensing* pode ser uma estratégia efetiva no combate a infecções microbianas. A quercetina age na atividade inibitória do *quorum-sensing* a partir de mudanças conformacionais entre o receptor e o complexo de quercetina formado, atuando como competidora de compostos sinalizadores e favorecendo a atividade antibacteriana e antibiofilme (GOPU et al., 2015).

Pelo exposto, pode-se concluir que flavonoides quercetínicos constituem um dos princípios ativos de extratos de *Kalanchoe pinnata* para a atividade antibacteriana. Sendo assim, estudos *in vitro* enfatizando a modulação e otimização da produção de flavonoides da espécie produzida por técnicas *in vitro* podem ser promissores na busca de novos agentes antimicrobianos.

Os dados obtidos no presente trabalho demonstram a capacidade regenerativa *in vitro* de *K. pinnata* em diferentes sistemas. Outros protocolos podem ser desenvolvidos para o estabelecimento *in vitro*, além do emprego de técnicas para a otimização e modulação da

produção de substâncias visando à avaliação em atividades biológicas diversas com relevância medicinal.

CONCLUSÕES

A partir dos objetivos propostos para a cultura de tecidos, avaliações fitoquímicas e do potencial medicinal de *Kalanchoe pinnata* foi possível concluir, para cada uma das abordagens, os seguintes pontos:

Quanto ao cultivo *in vitro*

- A suplementação com sacarose na concentração de 90 mM foi considerada a melhor alternativa como fonte de carbono visando ao desenvolvimento de gemas foliares para a produção de plantas *in vitro*, propiciando maior taxa de regeneração, números e comprimentos de folhas e raízes, após 60 dias de cultivo;
- A adição de citocininas e auxinas na concentração de 5 μ M otimizou o desenvolvimento de gemas em plantas *in vitro*, sem, contudo, induzir a multiproliferação de gemas ou plantas a partir de explantes de nervura mediana;
- A adição da auxina 2,4-D induziu a calogênese, a partir de explantes de nervura mediana ou de gemas. O uso de PIC estimulou a produção tanto de calos em nervura mediana quanto de raízes em gemas foliares;
- A cultura de células em suspensão pode ser obtida em meio MS líquido na presença de 5 μ M de PIC a partir do cultivo de folhas de plantas obtidas em MSØ sólido;
- Plantas regeneradas em meio sólido sem suplementação hormonal mostraram-se eficiente fonte de inóculo para cultura de raízes em meio líquido contendo AIB.

Quanto aos estudos fitoquímicos

- Flavonoides estão possivelmente presentes em todos os extratos de plantas obtidas *in vivo*, com exceção de raízes;
- Saponinas e taninos estão possivelmente presentes em todos os extratos de plantas obtidas *in vivo*, mas não foram observados em material produzido *in vitro*;

- A análise de massas para sinais obtidos por CLAE-UV-IES-EM a 240 nm revelou a presença de sete substâncias comuns aos extratos analisados de ambas as procedências.

Quanto ao potencial citotóxico

- De modo geral, os extratos aquosos não apresentaram citotoxicidade para a linhagem celular Hep-2, assim como os metanólicos para Caco-2;
- A linhagem T84 mostrou-se mais sensível à presença de extratos metanólicos e aquosos;
- Os flavonoides quercetina e rutina não apresentaram toxidez para as linhagens celulares avaliadas.

Quanto ao potencial antibacteriano

- Extratos de material obtido *in vivo* e a rutina apresentaram atividade na redução do crescimento de diversas cepas avaliadas;
- A quercetina foi capaz de inibir o crescimento de todas as cepas avaliadas, quando em concentração de 100 µg.mL⁻¹.

Quanto ao potencial antibiofilme

- A formação de biofilmes de EAEC 042 mostrou-se sensível à presença de extratos aquosos de folhas cultivadas *in vivo* e de plantas aclimatizadas, bem como extratos metanólicos da espécie e quercetina, mostrando redução no crescimento de biofilmes em torno de 50%.
- Na presença de quercetina, biofilmes de *Staphylococcus aureus* mostraram-se mais sensíveis em relação à EAEC 042;
- Os biofilmes mistos com as cepas de *S. aureus* e EAEC 042 conferiram maior resistência à atividade inibitória da quercetina em relação ao biofilme simples de *S. aureus*, porém, não maior do que o biofilme simples de EAEC 042;
- A quercetina possui atividade antibacteriana e antibiofilme para as cepas avaliadas, podendo ser um dos metabólitos ativos para a atividade antimicrobiana de *K. pinnata*.

REFERÊNCIAS

- ABDEL-AZIZ, S & AERON, A. Bacterial Biofilm: Dispersal and Inhibition Strategies. SAJ: Biotechnol. v1, n1, p. 1-10, 2014.
- ABUBAKAR, A.A.; OLADELE, H.A.; ADEJUMOKE, A.A.; KAYODE, F. Synergistic effect of combined extract of *Bryophyllumpinnatum* and *Aloe barbadensis* enhances antimicrobial activity *in-vitro*. Glo. Adv. Res. J. Med. Med. Sci., v.3, p.26-32, 2014.
- AGRAWAL, I. Susceptibility of bacterial biofilms against some leaf extracts. Plant, sci. feed, n. 5, p.69-73, 2011.
- AIBINU, I.E.; ODUNAYO, R.A.; ADENIPEKUN, T.; ADELOWOTAN, T.; ODUGBEMI, T. *In vitro* antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllumpinnatum* and *Kalanchoe crenata*. Afr. J. Trad. CAM, v.4, n.3, p.338-344, 2007.
- AKINPELU, D.A. Antimicrobial activity of *Bryophyllumpinnatum* leaves. Fitoterapia, n.71, p. 193-194, 2000.
- ARARUNA, M.K.A.; BRITO, S.A.; MORAIS-BRAGA, M.F.B.; SANTOS, K.K.A.; SOUZA, T.M.; LEITE, T.R.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Evaluation of antibiotic & antibiotic modifying activity of pilocarpine & rutin. Indian J. Med. Res., v.135, p.252-254, 2012.
- BAHMANI, R.; KARAMI, O.; GHOLAMI, M. Influence of carbon sources and their concentrations on rooting and hyperhydricity of apple rootstock MM.106. World Appl. Sci. J., v.6, n.11, p.1513-1517, 2009.
- BAISHYA, D.; SHARMA, N.; BORA, R. Green Synthesis of Silver Nanoparticle using *Bryophyllumpinnatum* (Lam.) and monitoring their antibacterial activities. Arch. Appl. Sci. Res., v.4, n.5, p.2098-2104, 2012.
- BANSO, A. & ADEYEMO, S.O. Evaluation of antibacterial properties of tannins isolated from *Dichrostachyscinerea*. Afr. J. Biotechnol., v.6, n.15, p.1785-1787, 2007.
- BARBOSA, W.L.R. Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. Rev Científica da UFPA, v.4, p.12-18, 2001.
- BERGER, A. Crassulaceae. In: Engler, A. & Prantl, K., Die Natürlichen Pflanzenfamilien, 2 ed., 18A, p.352-483, 1930.
- BERRY, A.A., YANG, Y., PAKHARUKOVA, N., GARNETT, J.A., LEE, W., COTA, E., MARCHANT, J., ROY, S., TUITTILA, M., LIU, B., INMAN, K.G., RUIZ-PEREZ, F., MANDOMANDO, I., NATARO, J.P., ZAVIALOV, A., MATTHEWS, S. Structural insight into host

- recognition by aggregative adherence fimbriae of enteroaggregative *Escherichia coli*. PLOS Pathogens. v.10, p.1-15, 2014.
- BIRD, B.R. & FORRESTER, F.T. Basic laboratory techniques in cell cultures. U.S. Department of health and human services, CDC, Atlanta, 1981.
- BISWAS, S.K.; CHOWDHURY, A.; DAS, J.; KARMAKAR, U.K.; SHILL, M.C. Assessment of cytotoxicity and antibacterial activities of ethanolic extracts of *Kalanchoe pinnatifida* (family: Crassulaceae) leaves and stems. Int. J. of Pharm. Sci. and Res., v.2, n.10, p. 2605-2609, 2011.
- BORGES, A.; ABREU, A.C.; MALHEIRO, J.; SAAVEDRA, M.J.; SIMÕES, M. Biofilm prevention and control by dietary phytochemicals. In: MÉNDEZ-VILAS, A. Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education. Badajoz: Formatex Research Center; Microbiology Book Series, v.1, p.32-41, 2013.
- BUENO, J. Anti-biofilm drug susceptibility testing methods: looking for new strategies against resistance mechanism. J. Microbial Biochem. Technol. v.1, p.1-9, 2014.
- CALDAS, L.S.; HARIDASAN, P.; FERREIRA, M.E. Meios nutritivos. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética em plantas. Brasília: Ed. da Embrapa, v.1, p.87-132, 1998.
- CHANG, C.C.; YANG, M.H.; WEN, H.M.; CHERN, J.C. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. J. of Food and Drug Anal., v.10, n.3, p.178-182, 2002.
- CHERNETSKYY, M. Problems in nomenclature and systematics in the subfamily Kalanchoideae (Crassulaceae) over the years. Acta Agrobot., v.64, n.4, p.67-74, 2011.
- CID, L.P.B. Suspensão celular. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética em plantas. Brasília: Ed. da Embrapa, v.1, p.161-181, 1998.
- COSTA, G.M.; ORTMANN, C.F.; SCHENKEL, E.P.; REGINATTO, F.H. An HPLC-DAD method to quantification of main phenolic compounds from leaves of *Cecropia* species. J. Braz. Chem. Soc., v.22, n.06, p. 1096-1102, 2011.
- CRUZ, P.C.; CHEDIER, L.M.; PEIXOTO, P.H.P.; FABRI, R.L.; PIMENTA, D.S. Effects of light intensity on the distribution of anthocyanins in *Kalanchoe brasiliensis* Camb. and *Kalanchoe pinnatifida* (Lamk.) Pers. An. Acad. Bras. Cienc., v.84, p.1-7, 2012.
- DELICHEH, K.S.; KASHEFI, B.; MOHAMMADHASSAN, R. A review optimization of tissue culture medium medicinal plant: Thyme. Intl. J. Farm. & Alli. Sci., v.3, n.9, p.1015-1019, 2014.

- EDEWOR, T.I.; IBIKUNLE, G.J.; USMAN, L.A. Phytotoxic and antimicrobial screening of saponin isolated from ethanolic leaf extract of *Xylopiiaethiopioca*. *Sci. Focus*, v.14, n.4, p.507-512, 2009.
- FILOVÁ, A. Production of secondary metabolites in plant tissue cultures. *Res. J. Agricult. Sci.*, v.46, p.236-245, 2014.
- GARCÊS, H.M.P.; CHAMPAGNE, C.E.M.; TOWNSLEY, B.T.; PARK, S.; MALHÓ, R.; PEDROSO, M.C.; HARADA, J.J.; SINHA, N.R. Evolution of asexual reproduction in leaves of the genus *Kalanchoe*. *PNAS*, v.104, n.39, p.15578-15583, 2007.
- GATTO, M.T., FALCOCCHIO, S., GRIPPA, E., MAZZANTI, G., BATTINELLI, L., NICOLSI, G., LAMBUSTA, D., SASO, L. Antimicrobial and anti-Lipase activity of quercetin and its C2-C16 3-O-Acyl-Esters. *Bioorg. & Med Chem.* v.10, p.269-272, 2002.
- GAUCHAN, D.P. Effect of different sugars on shoot regeneration of maize (*Zea mays* L.). *Kathman. Un. J. Sci. Eng. Technol.*, v.8, p.119-124, 2012.
- GEORGE, E.F. & DEBERGH, P.C. Micropropagation: Uses and Methods. In: GEORGE, E.F.; HALL, M.A.; KLERK, G.J. *Plant propagation by tissue culture*. 3 Ed., Dordrecht: Springer, p.29-64, 2008.
- GONZÁLEZ-GRANDÍO, E. & CUBAS, P. Identification of gene functions associated to active and dormant buds in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.*, v.9, p1-3, 2014.
- GOPU, V.; MEENA, C.K.; SHETTY, P.H. Quercetin influences quorum sensing in food borne bacteria: *in-vitro* and *in-silico* evidence. *PLoS ONE*, v.10, n.8, p.1-17, 2015.
- GRATTAPAGLIA, D. & MACHADO, M.A. Micropropagação In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. *Cultura de tecidos e transformação genética em plantas*. Brasília: Ed. da Embrapa, v.1, p. 331-353, 1998.
- GYAWALI, R. & IBRAHIM, S.A. Natural products as antimicrobialagents. *Food Control*, v.46, p.412-429, 2014.
- HABIBI, P.; PIRI, K.; DELJO, A.; MOGHADAM, Y.; GHIASVAND, T. Increasing scopolamine content in hairy roots of *Atropa belladonna* using bioreactor. *Braz. Arch. Biol. Technol.*, p. 1-9, 2014.
- HAM, R. C. H. J. V. & 'T HART, H. Phylogenetic relationships in the Crassulaceae inferred from chloroplast DNA restriction-site variation. *Am. J. Bot.*, v.85, p.123-134, 1998.
- HUTTNER, A., HARBARTH, S.; CARLET, J.; COSGROVE, S.; GOOSSENS, H.; HOLMES, A.; JARLIER, V.; VOSS, A.; PITTER, D. Antimicrobial resistance: a global view from the 2013 World Healthcare-Associated Infections Forum. *Antimicrob. Resist. Infect. Control*, v.2, n.31, p.1-13, 2013.

- KANNABIRAN, K.; MOHANKUMAR, T.; GUNASEKER, V. Evaluation of antimicrobial activity of saponin isolated from *Solanum xanthocarpum* and *Centella asiatica*. IJNES, v.3, p.25-28, 2009.
- KERBAUY, G.B. Cultura de raízes e regeneração de plantas. In: TORRES, A.C.; CALDAS, L.S.; BUSO, J.A. Cultura de tecidos e transformação genética em plantas. Brasília: Ed. da Embrapa, v.1, p.161-181, 1998.
- KHAN, S.; NAZ, S.; ALI, K.; ZAIDI, S. Direct organogenesis of *Kalanchoe tomentosa* (Crassulaceae) from shoot-tips. Pak. J. Bot., v.38, n.4, p.977-981, 2006.
- KUMAR, S.; MALIK, D.K.; KUMAR, R. Antimicrobial effects of *Mangifera indica*, *Bombax ceiba*, *Syzygium cumini* and *Kalanchoe pinnata* against acne-inducing bacteria. Asian J. Exp. Biol. Sci. v.4, n.4, p.645-647, 2013.
- LEAL-COSTA, M.V.; NASCIMENTO, L.B.S.; MOREIRA, N.S.; REINERT, F.; COSTA, S.S.; LAGE, C.L.S.; TAVARES, E.S. Influence of blue light on the leaf morphoanatomy of *in vitro* *Kalanchoe pinnata* (Lamarck) Persoon (Crassulaceae). Microsc. Microanal., v.16, p.576-582, 2010.
- LEE, J.H.; PARK, J.H.; CHO, H.S.; JOO, S.W.; CHO, M.H.; LEE, J. Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus*. Biofouling, v.29, n.5, p.491-499, 2013.
- LEE, J.H.; KIM, Y.G.; CHO, H.S.; RYU, S.Y.; CHO, M.H.; LEE, J. Coumarins reduce biofilm formation and the virulence of *Escherichia coli* O157:H7. Phytomedicine, v.21, p.1037-1042, 2014a.
- LEE, J.H.; KIM, Y.G.; CHO, H.S.; RYU, S.Y.; CHO, M.H.; LEE, J. Ginkgolic acids and Ginkgo biloba extract inhibit *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* biofilm formation. Int. J. of Food Microbiol., v.174, p.47-55, 2014b.
- LI, J.; ATTILA, L.; WOOD, T.K.; VALDES, J.J.; BENTLEY, W.E. Quorum sensing in *Escherichia coli* is signaled by ai-2/lsrR: effects on small rna and biofilm architecture. J. of Bacteriol., v.189, n.16, p.6011-6020, 2007.
- LIM, S.H.; DARAH, I.; JAIN, K. Antimicrobial activities of tannins extracted from *Rhizophora apiculata* barks. J. Trop. Forest. Sci., v.18, p.59-65, 2006.
- LOPES, R.M., OLIVEIRA, T.T., NAGEM, T.J., PINTO, A.S. Flavonoides. Biotec. Ciencia & Des. v.17, p.18-22, 2000.
- MAATALAH, M.B.; BOUZIDI, N.K.; BELLAHOUEL, S.; MERAH, B.; FORTAS, Z.; SOULIMANI, R.; SAIDI, S.; DERDOUR, A. Antimicrobial activity of the alkaloids and

- saponin extracts of *Anabasis articulata*. J. Biotechnol. Pharm. Res., v.3, n.3, p.54-57, 2012.
- MAJAZ, Q.; NAZIM, S.; SHAIKH, S.; GOMASE, P.; CHOUDHARI, A. Phytochemical analysis of chloroform extract of roots of *Kalanchoe pinnata* by HPLC and GCMS. IJRAP, v.2, n.7, p.1693-1699, 2011a.
- MAJAZ, A.Q.; TATIYA, A.U.; KHRURSHID, M.; NAZIM, S.; SIRAJ, S. The miracle plant (*Kalanchoe pinnata*): a phytochemical and pharmacological review. IJRAP, v.5, n.2, p.1478-1482, 2011b.
- MAJAZ, Q.; NAZIM, S.; AFSAR, S.; SIRAJ, S.; SIDDIK, P. Evaluation of antimicrobial activity of roots of *Kalanchoe pinnata*. Int. J. Pharmacol. Bio. Sci. v.5, p.93-96, 2011c.
- MASON, M.G.; ROSS, J.J.; BABST, B.A.; WIENCLAW, B.N.; BEVERIDGE, C.A. Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. PNAS, v.111, n.6, p.6092-6097, 2014.
- MEGAWATI, A.D. & FAJRIAH, S. 3',4'-Dimethoxy Quercetin, a flavonol compound isolated from *Kalanchoe pinnata*. J. Applied Pharm. Sci., v.3, p.88-90, 2013.
- MELLO, M.O.; DIAS, C.T.S.; AMARAL, A.F.C.; MELO, M. Growth of *Bauhinia forficata* Link, *Curcuma zedoaria* Roscoe and *Phaseolus vulgaris* L. cell suspension cultures with carbon sources. Sci. Agri., v.58, n.3, p.481-485, 2001.
- MERKL, R.; HRADKOVA, I.; FILIP, V.; SMIDRKAL, J. Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. Czech J. Food Sci., v.28, n.4, p.275-279, 2010.
- MILAD, R.; EL-AHMADY, S.; SINGAB, A.N. Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae): a review of its ethnomedicinal, botanical, chemical and pharmacological properties. European J. Med. Plants, v.4, p.86-104, 2014.
- MITTAL, A.K., KUMAR, S., BANERJEE, U.C. Quercetin and gallic acid mediated synthesis of bimetallic (silver and selenium) nanoparticles and their antitumor and antimicrobial potential. J. of Col. and Int. Sci. v.431, p.194-199, 2014.
- MIZONOBÉ, G. Basic research on tissue cultures of *Kalanchoe pinnata* Pers.; Part 1, study of medium element conditions for callus formation from leaves. J. of Environ. Sci. Lab., v.8, p.345-356, 2001.
- MOLNÁR, Z.; VIRÁG, E.; ÖRDÖG, V. Natural substances in tissue culture media of higher plants. Acta Biol. Szeged., v.55, p.123-127, 2011.
- MORT, M.E.; SOLTIS, D.E.; SOLTIS, P.S.; FRANCISCO-ORTEGA, J.; SANTOS-GUERRA, A. Phylogenetic relationships and evolution of Crassulaceae inferred from *matK* sequence data. Am. J. Bot., v.88, p.76-91, 2001.

- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, v.15, p.473-479, 1962.
- MUZITANO, M.F., TINOCO, L.W., GUETTE, C., KAISER, C., ROSSI-BERGMANN, B., COSTA, S.S. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochem.* v.67, p.2071-2077, 2006.
- MUZITANO, M.F.; BERGONZI, M.C; DE MELO, G.O; LAGE, C.L.S; BILIA, A.R.; VINCIERI, F.F.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S.S. Influence of cultivation conditions, season of collection and extraction method on the content of antileishmanial flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *J. of ethnopharmacol.*, v.133, p.132-137, 2011.
- NAMASIVAYAM, S.K.R. & ROY, E.A. Antibiofilm effect of medicinal plant extracts against clinical isolate of biofilm of *Escherichia coli*. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci*, v.5, n.2, p.486-489, 2013.
- NAZ, S.; JAVAD, S.; ILYAS, S.; ALI, A. An efficient protocol for rapid multiplication of *Bryophyllum pinnatum* and *Bryophyllum daigremontianum*. *Pak. J. Bot.*, v.41, n.5, p.2347-2355, 2009.
- NITIEMA, L.W.; SAVADOGO, A.; SIMPORE, J.; DIANOU, D.; TRAORE, A.S. *In vitro* antimicrobial activity of some phenolic compounds (coumarin and quercetin) against gastroenteritis bacterial strains. *Intl. J. Microbiol. Res.*, v.3, n.3, p.183-187, 2012.
- NOHYNEK, L.J.; ALAKOMI, H.L.; KAHKONEN, M.P.; HEINOMEN, M.; HELANDER, I.M.; OKSMAN-CALDENTY, K.M.; PUUPPONEN-PIMIA, R.H. Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutrition and Cancer*, v.54, p.18-32, 2006.
- NWADINIGWE, A.G. Antimicrobial activities of methanol and aqueous extracts of the stem of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae). *Afr. J. of Biothechnol.*, v.10, n.72, p.16342-16346, 2011.
- OKWU, D.E. & NNAMDI, F.U. A Novel Antimicrobial phenanthrene alkaloid from *Bryophyllum pinnatum*. *E-J. of Chem.*, v.8, n.3, p.1456-1461, 2011a.
- OKWU, D.E. & NNAMDI, F.U. Two novel flavonoids from *Bryophyllum pinnatum* and their antimicrobial Activity. *J. Chem. Pharm. Res.*, v.3, n.2, p.1-10, 2011b.
- OLIVEIRA, L.F.G.; GILBERT, B.; VILLAS BÔAS, G.K. Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos. *Fitos*, v.8, p.33-41, 2013.
- OLIVOTO, T.; NARDINO, M.; CARVALHO, I.R.; FOLLMANN, D.N.; SZARESKEI, V.J.; FERRARI, M.; PELEGRIN, A.J.; SOUZA, V.Q. Plant secondary metabolites and its

- dynamical systems of induction in response to environmental factors: A review. *Afr. J. Agric. Res.*, v.12, n.2, p. 71-84, 2017.
- OTÁLVARO-ÁLVAREZ, A.M. & VELÁSQUEZ-LOZANO, M.E. Obtención de escopolamina en biorreactor a partir de cultivos de raíces de *Brugmansiacandida*. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, v.38, n.146, p.35-42, 2014.
- OZÇELİK, B.; ORHAN, I.; TOKER, G. Antiviral and antimicrobial assessment of some selected flavonoids. *Z. Naturforsch.*, v.61, p.632-638, 2006.
- PAIVA NETO, V.B. & OTONI, W.C. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture: does it matter? *Sci. Hort.*, v.97, p.193-202, 2003.
- PARKER, J.D.; SALMINEN, J.P.; AGRAWAL, A.A. Evolutionary potential of root chemical defense: genetic correlations with shoot chemistry and plant growth. *J. Chem. Ecol.*, v.38, p.992–995, 2012.
- PANATHULA, C.S.; MAHADEV, M.D.; NAIDU, C.V. GAUCHAN, D.P. Effect of different carbohydrates on *in vitro* plant regeneration of *Centellaasiatica* (L.) - an important antijaundice medicinal plant. *Int. J. Med. Arom. Plants*, v.4, p.41-47, 2014.
- PATTEWAR, S.V.; PATIL, D.N.; DAHIKAR, S.B. Antimicrobial potential of extract from leaves of *Kalanchoe pinnata*. *Int. J. of Pharm. Sci and Res.*, v.4, n.12, p. 4577-4580, 2013.
- PHILLIPS, G.C. Invited review: *in vitro* morphogenesis in plants – recent advances. *In Vitro Cell. Dev. Biol.—Plant*, v.40, p.342-345, 2004.
- PINTO, J.S.; OLIVEIRA, A.K.M.; FERNANDES, V.; MATIAS, R. Ethnobotany and popular culture in the use of plants in settlements on the southern edge of southern pantanal Mato Grosso. *Biosc. J.*, v.33, p.193-2013, 2017.
- PRASAD, V.G.N.V., KRISHNA, B.V., SWAMY, P.L., RAO, T.S., RAO, G.S. Antibacterial synergy between quercetin and polyphenolic acids against bacterial pathogens of fish. *Asian Pac. J. of Trop. Dis.*, v.4, p.326-329, 2014.
- RAHMAN, A.E., MOINUDDIN, M., MOLLA, M., WORKU, A., HURT, L., KIRKWOOD, B., MOHAN, S.B., MAZUMDER, S., BHUTTA, Z., RAZA, F., MREMA, S., MASANJA, H., KADOBERA, D., WAISWA, P., BAHL, R., ZANGENBERG, M., MUHE, L. Childhood diarrhoeal deaths in seven low- and middle-income countries. *Bull. World Health Organ.* v.92, p.664-671, 2014.
- RAJ, A.; GURUJARA, M.P.; JOSHI, H.; SHARSTRY, C.S. *Kalanchoe pinnatum* in treatment of gallstones: an ethnopharmacological review. *Int. J. PharmTech. Res.*, v.6, p.252-261, 2014.

- RAMOS, F.A.; TAKAIASHI, Y.; SHIROTORI, M.; KAWAGUCHI, Y.; TSUCHIYA, K.; SHIBATA, H.; HIGUTI, T.; TADOKORO, T.; TAKEUCHI, M. Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) Skin. J. Agric. Food Chem., v.54, p.3551-3557, 2006.
- SANTOS, M.R.A.; FERREIRA, M.G.R.; GUIMARÃES, M.C.M.; LIMA, R.A.; OLIVEIRA, C.L.L.G. Callogenesis in leaves of *Kalanchoe pinnata* Lam. by 2,4-D and BA action. Rev. Bras. Pl. Med., v.16, n.3., p.760-764, 2014.
- SARANRAJ, P. & SIVASAKTHI, S. Medicinal plants and its antimicrobial properties: a review. Global J. Pharmacol., v.8, n.3, p.316-327, 2014.
- SILVA, C.G.; ALMEIDA, V.L.; CAMPANA, P.R.V.; ROCHA, M.P. Plant cell cultures as producers of secondary metabolites: *Podophyllum* lignans as a model. In: JHA, S. Transgenesis and secondary metabolism. Springer International Publishing (online), 2017.
- SHAKYA, A.K. Medicinal plants: future source of new drugs. Int. J. of Herb. Med., v.4, n.4, p.59-64, 2016.
- SHARMA, A.; BHOT, M.; CHANDRA, N. *In vitro* antibacterial and antioxidant activity of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz. Int. J. Pharm. Pharm. Sci., v.6, p.558-560, 2014.
- SINGH, P. & PATEL, R.M. Factors influencing *in vitro* growth and shoot multiplication of pomegranate. The Bioscan, v.9, n.3, p.1031-1035, 2014.
- SOBERÓN, J.R.; SGARIGLIA, M.A.; SAMPIETRO, D.A.; QUIROGA, E.N.; VATTUONE, M.A. Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. J. of appl. Microbiol., v.102, p.1450-1461, 2007.
- SUPRATMAN, U.; FUJITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. New insecticidal Bufadienolide, Bryophyllin C, from *Kalanchoe pinnata*. Biosc. Biotechnol. Biochem., v.64, n.6, p.1310-1312, 2000.
- SUPRATMAN, U.; FUJITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H.; MURAKAMI, A.; SAKAI, H.; KOSHIMIZU, K.; OHIGASHI, H. Anti-tumor promoting activity of bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *Kalanchoe daigremontiana* × *tubiflora*. Biosc. Biotechnol. Biochem., v.65, n.4, p.947-949, 2001.
- TAPAS, A.R., SAKRKR, D.M., KAKDE, R.B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. Trop. J. of Pharm. Res. v.7, p.1089-1099, 2008.
- TATSIMO, S.J.N.; TAMOKOU, J.D.; HAVYARIMANA, L.; CSUPOR, D.; FORGO, P.; HOHMANN, J.; KUIATE, J.R.; TANE, P. Antimicrobial and antioxidant activity of

- kaempferol rhamnoside derivatives from *Bryophyllumpinnatum*. BMC Res. Notes, v.5, n.158, p. 1-6, 2012.
- ULLAH, S.; N, N.; ULLAH, M.; JABEEN, N. Effect of growth regulators on micro propagation of different olive cultivars (Olea europaea). Int. Res. J. Agricult. Aqua. Sci., v.1, n.1, p.9-14, 2014.
- VIKRAM, A.; JAYAPRAKASHA, G.K.; JESUDHASAN, P.R.; PILLAI, S.D.; PATL, B.S. Suppression of bacterial cell–cell signalling, biofilm formation and type III secretion system by citrus flavonoids. J. of Appl. Microbiol., v.109, p.515-527, 2010.
- VILLASECA, J.M.; HERNANDEZ, U.; SAINZ-ESPUNES, T.R.; ROSARIO, C.; ESLAVA, C. Enteroaggregative *Escherichia coli*: an emergent pathogen with different virulence properties. Rev. Latinoam. Microbiol., v.47, n.3-4, p.140-159, 2005.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Medicinal plants in Papua New Guinea. Geneva: WHO Press, 2009.
- WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. Geneva: WHO Library Cataloguing, 2014.
- YOO, K.S.; LEE, E.J.; PATIL, B.S. Quantification of quercetin glycosides in 6 onion cultivars and comparisons of hydrolysis-HPLC and spectrophotometric methods in measuring total quercetin concentrations. J. of Food Sci. v.75, n.2, p. 160-165, 2010.
- YUE, W.; MING, Q.L.; LIN, B.; RAHMAN, K.; ZHENG, C.L.; HAN, T.; QIN, L.P. Medicinal plant cell suspension cultures: pharmaceutical applications and high-yielding strategies for the desired secondary metabolites. Crit. Rev. Biotechnol., v.1, n.1, p.1-18, 2014.
- ZABALAK, D.; POSPISILOVA, H.; SMEHILOVA, M.; MRIZOVA, K.; FREBORT, I.; GALUSZKA, P. Genetic engineering of cytokinin metabolism: Prospective way to improve agricultural traits of crop plants. Biotechnol. Adv., p.1-21, 2012.

APÊNDICE –Artigo publicado

academicJournals

Vol. 10(41), pp. 763-770, 3 November, 2016
 DOI: 10.5897/JMPR2016.6260
 Article Number: 0D3935261459
 ISSN 1996-0875
 Copyright © 2016
 Author(s) retain the copyright of this article
<http://www.academicjournals.org/JMPR>

Journal of Medicinal Plants Research

Full Length Research Paper

Cytotoxic, antibacterial and antibiofilm activities of aqueous extracts of leaves and flavonoids occurring in *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers.

Thiago José de Souza Barboza¹, Andréa Fonseca Ferreira², Ana Claudia de Paula Rosa Ignácio² and Norma Albarello^{1*}

¹Laboratório de Biotecnologia de Plantas, Departamento de Biologia Vegetal, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

²Laboratório 1, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Received 20 September, 2016; Accepted 19 October, 2016

Several investigations have demonstrated *in vitro* antibacterial activity of plant extracts. *Kalanchoe pinnata* is globally used in folk medicine for the treatment of various diseases, such as diarrhea, infections, tuberculosis and fever. Among the enteropathogenic bacteria, enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is an important cause of diarrhea in the world. EAEC is also capable of forming biofilms, conformation that provides antibiotic resistance and a high degree of dispersion and reinfection, which may represent up to 80% of causes of human microbial infections. Thus, it becomes necessary to search for new antimicrobial agents with activity against biofilms. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic, antibacterial and antibiofilm in EAEC from aqueous extracts of leaves and the flavonoids quercetin and rutin, occurring in *K. pinnata*. Leaf aqueous extracts were obtained and evaluated phytochemically. The cytotoxic activity was evaluated in human carcinoma cell lines HEP-2, Caco-2 and T84. The antibacterial activity was evaluated by the macrodilution method and the evaluation of antibiofilm activity was performed in *Escherichia coli* enteroaggregative (EAEC 042). Aqueous extracts of *K. pinnata* do not show toxicity to Hep-2, but all other cell lines were sensitive to this extract. Instead, the flavonoids quercetin and rutin showed no cytotoxicity with any of the tested cell lines. Quercetin is capable of inhibiting bacterial growth of all tested strains. The aqueous leaf extract and quercetin were able to inhibit EAEC 042 biofilm formation above 50%. The results indicate the potential use of the species in treatment of bacterial infections.

Key words: Antimicrobials, EAEC 042, biofilms, quercetin, Crassulaceae.

INTRODUCTION

Kalanchoe pinnata (Lam.) Pers., also referred by its synonym *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz., is a species of the Crassulaceae family, commonly known in Brazil as saão-roxo (Oliveira et al., 2003). This plant

*Corresponding author. E-mail: labplan_uerj@yahoo.com.br. Tel: 55 021 223340273. Fax: 55 021 23340595.

Author(s) agree that this article remain permanently open access under the terms of the [Creative Commons Attribution License 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

is commonly used for various medical applications, such as in the treatment of diarrhea, conjunctivitis, dermatitis, eczema, fever, infections, tuberculosis, respiratory infections, inflammation, among others (Majaz et al., 2011).

The *in vitro* antibacterial activity of various extracts from *K. pinnata* had been reported in the literature, like methanolic and alcoholic extracts from leaves, stem and roots. Among the bacterial species susceptible to these extracts are *Enterococcus faecalis* (Albinu et al., 2007), *Escherichia coli* (Pattewar et al., 2013), *Klebsiella pneumoniae* (Okwu and Nnamdi, 2011), *Pseudomonas aeruginosa* (Tatsimo et al., 2012), *Salmonella typhi* (Nwadinigwe, 2011), *Shigella dysenteriae* (Akinpelu, 2000), *Staphylococcus aureus* (Biswas et al., 2011), and others. Among the enteropathogenic bacteria, enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is an important cause of diarrhea in the world, being related to cases of diarrhea of persistent diarrhea especially in children, HIV-infected individuals and from travelers in developing countries (Berry et al., 2014). In these countries, the cause of death due to persistent diarrhea in infants between 1 and 11 months is 30%. In children up to 4 years old this rate can reach 69% (Rahman et al., 2014).

In addition to its aggregative ability in human intestinal cells, EAEC is able to form biofilms on surfaces. This configuration provides antibiotic resistance and a high degree of dispersion and reinfection, which may represent up to 80% of causes of human microbial infections (Bueno, 2014). The nature of biofilms is able to protect them from adverse conditions such as desiccation, UV, toxic compounds and antibiotics, favoring the persistence (Abdel-Aziz and Aeron, 2014). Thus, is it important to search for new antimicrobial agents with activity against biofilms.

Much of the antimicrobial activity of plant extracts is related to the action of flavonoids, substances that also have nutraceutical importance, due to the organoleptic properties of food and pharmacological activities on human health (Tapas et al., 2008).

Although not produced by the human metabolism, flavonoids have various pharmacological activities such as anti-allergic, anti-inflammatory and anti-ulcer. Over four thousand substances belonging to the group have been identified, having highlighted in *K. pinnata*, the compounds of the group of flavonols, such as quercetin and rutin (Lopes et al., 2000).

For quercetin, important antimicrobial properties have been identified, such as antileishmanial (Muzitano et al., 2006; Muzitano et al., 2011) and antibacterial (Gatto et al., 2002; Mittal et al., 2014; Prasad et al., 2014), being a metabolite of great interest in antimicrobial studies.

Thus, the objective of this study was to evaluate the cytotoxic activity in different cell lines, antibacterial activity in different strains and antibiofilm in EAEC from

aqueous extracts of leaves and the flavonoids quercetin and rutin, occurring in *K. pinnata*.

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Samples of *K. pinnata* were collected in Jacarepaguá (Rio de Janeiro/Brazil) and a voucher specimens was deposited in the Herbarium of the University of the State of Rio de Janeiro (UERJ) under the number HRJ12515.

For the different analyses, samples of *K. pinnata* were grown in the greenhouse at UERJ. Plants were cultivated under *in vivo* conditions, in containers using fertilized soil, under sunlight and were watered twice a day. Samples of material were collected in the summer, between the months of November 2014 and February 2015, for the production of extracts and phytochemical analysis.

Phytochemical analysis

For the phytochemical analysis and evaluation of the medicinal potential of *K. pinnata*, aqueous extracts were prepared from leaves according to the methodology proposed by Muzitano et al. (2011).

This fresh material was mechanically macerated and heated in distilled water at 20% (w/v) for 30 minutes at 50°C. After this period, the material was filtered, frozen at -20 and then lyophilized under pressure of 60 µmHg at -59°C. After lyophilization, the material was resuspended in sterile distilled water at the concentrations required for experimentation.

The flavonoids quercetin and rutin (Sigma-Aldrich) were used as standard substances for analysis, being solubilized 1 mg.mL⁻¹ of substance in methanol (MeOH).

The qualitative analysis for the phytochemical aqueous extracts was performed following the protocol proposed by Barbosa (2001). Groups of secondary metabolites of medicinal interest were evaluated, including flavonoids, alkaloids, saponins, phenols and tannins.

Cytotoxic activity of *K. pinnata* extracts

In order to evaluate the cytotoxic activity, cell lines that represent cells related to passage of aqueous extract in the gastrointestinal tract were selected. Thus, the cell lines HEP-2 (ATCC CCL23 originating from human larynx carcinoma), Caco-2 (ATCC HTB37, originating from human colon adenocarcinoma) and T84 (ATCC CCL248 originating colon rectal carcinoma) were used in the study.

The aqueous extracts were evaluated at concentrations of 500 and 1000 µg.mL⁻¹ and the flavonoids quercetin and rutin at the concentration of 50 µg.mL⁻¹. The assay was performed in 96-well plates showing confluent layer of cells and cultivated in 100 µL of DMEM or MEM medium per well. In each culture well 100 µL extract or flavonoids solubilized in PBS-D were added, keeping the culture for 24 h at 37°C and 5% of CO₂.

In the corresponding period of three hours before the end of cultivation (45h) 5 mg.mL⁻¹ of solution of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT) was added. After this period, the plate was centrifuged at 3000 rpm for 5 min to deposition of MTT crystals formed. The supernatant was discarded and the crystals diluted by adding 100 µL of DMSO (100%) in each well.

The reading was performed in a microplate reader at 492 nm. As

negative controls, cell cultures were used in the absence of treatment and cultivation in the presence of 5% methanol. As a positive control, cells were cultured in the presence of 100% methanol. The experiments were performed in triplicate and repeated three times or more.

Antibacterial activity

In all assays, reference strains were used, obtained mostly from the American Type Culture Collection (ATCC, Rockville, MD, USA) and the other, of the collection of the Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, UERJ (Table 1).

The evaluation of the antimicrobial activity of the aqueous extract and flavonoids has been carried out by the method of agar dilution (macrodilution) used by Soberon et al. (2007) with some modifications.

The bacterial strains were grown in 15x100 mm test tubes containing 3 ml of Mueller-Hinton Broth (MHB, Oxoid, Ltd.), incubated at 37°C for 18 h. The extract, at 1000 µg.mL⁻¹ and the flavonoids, at the concentrations of 10 and 100 µg.mL⁻¹ were solubilized in 20 ml of Mueller-Hinton Agar (MHA), not yet solidified, and poured into 90 mm petri dishes. As negative controls of the experiment were used MHA medium and the same medium plus 1 and 10% of MeOH representing the final concentration of solvent after solubilization of quercetin and rutin.

For each treatment, 2 µL of each bacterial suspension in duplicate were plotted on the plate. The growth of colonies was evaluated after 24 h incubation at 37°C. All the material and culture media were sterilized by autoclaving at 121°C for 20 min. The experiments were repeated three times or more.

Evaluation of biofilm formation of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC 042)

The evaluation of the growth of biofilms of EAEC 042 was performed based on the spectrophotometric assay of biofilm inhibition, using as reference the working of Namaziavayam and Roy (2013) with some modifications.

E. coli suspensions were adjusted and standardized to 0.14 nm of optical density (OD), and added 100 µL of the suspension in 96 well plates. Then the extract and flavonoids was added in triplicate, being the culture maintained in incubation for 18 h at 37°C. The aqueous extract was evaluated at 1000 µg.mL⁻¹ and the flavonoids quercetin and rutin in concentrations of 5 and 50 µg.mL⁻¹.

After incubation, the supernatant was discarded and added 100 µL of crystal violet solution (1% w/v) for 30 min. After this period, the solution was removed and wells were washed with PBS-D, and then added 100 µL of 95% ethanol, keeping incubation for 15 min for solubilization of the crystals. The reading was performed in microplate reader at 570 nm. The calculation of the percentage inhibition of biofilm formation was in accordance with the formula:

$$\% \text{ of inhibition} = \frac{\text{OD in control} - \text{OD in treatment} \times 100}{\text{OD in control}}$$

Statistical analysis

The experiment with comparisons between controls was performed by the analysis of variance of the means obtained (ANOVA) using the program GraphPad PRISM®, being carried out after Bonferroni

post-test, with $p < 0.05$.

RESULTS

Phytochemical analysis

Phytochemical analysis of *K. pinnata* leaf extracts used in the experiments (Table 2) showed the presence of flavonoids, saponins, phenols and tannins.

Cytotoxic activity of *K. pinnata* extracts

In cell cultures of HEP-2 (Figure 1a) the aqueous extract of leaves showed no toxicity. However, Caco-2 and T84 strains (Figure 1b and c) were more sensitive to the culture in the presence of the extract in a high concentration (1000 µg.mL⁻¹).

The flavonoids quercetin and rutin and the methanol at a concentration of 5% showed no toxicity for the cultivation of different cell lines evaluated.

Antibacterial activity

The aqueous extracts of *K. pinnata* showed antibacterial activity, reducing the growth of *Citrobacter freundii*, *Bacillus thuringiensis*, *Shigella sonnei* and *Escherichia coli* K-12 (HB 101) grown in the presence of aqueous leaf extract obtained from plants grown *in vivo* (Table 2).

At 10 µg.mL⁻¹, rutin was able to reduce the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and *C. freundii*. Have quercetin in same concentration reduced the growth of *P. aeruginosa*, *C. freundii*, *E. coli* (17-2), *Serratia marcescens* and *B. thuringiensis*. When the concentration of these flavonoids is raised to 100 µg.mL⁻¹ in culture, the rutin is able to reduce the growth of all strains with the exception of *Enterococcus faecalis*, whereas quercetin inhibited the growth of all analyzed strains (Table 3).

The controls using methanol are related to the final concentration of solvent in the plate containing quercetin or rutin, due to the fact of these substances are soluble only in this condition. At 10%, methanol in culture showed influence on the growth of *P. aeruginosa*, *C. freundii*, *E. coli* (17-2), *E. coli* (ATCC 25922) and *Staphylococcus aureus*.

Therefore, results of reduction or inhibition of growth of these strains in the presence of 100 µg.mL⁻¹ of rutin and quercetin cannot be considered due to the possible influence of the solvent in cultivation. Conversely, such as 10% methanol in culture has no influence on the growth of other strains, these results can be validated.

Antibiofilm activity

The formation of biofilms of enteroaggregative *E. coli*

Table 1. Strains used in the evaluation of the antibacterial potential of *Kalanchoe pinnata*.

Gram-positive		Gram-negative	
Species	Strain	Species	Strain
<i>Bacillus thuringiensis</i>	ATCC 33679	<i>Citrobacter freundii</i>	ATCC 12241
<i>Enterococcus faecalis</i>	29212	<i>Escherichia coli</i>	EAEC 17-2
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC 25923	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 25922
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	ATCC 15305	<i>Escherichia coli</i>	ATCC 35218
<i>Staphylococcus simulans</i>	ATCC 27851	<i>Escherichia coli</i>	042
<i>Streptococcus pyogenes</i>	8668	<i>Escherichia coli</i> K-12	C600
		<i>Escherichia coli</i> K-12	HB 101
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	ATCC 700603
		<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	ATCC 27853
		<i>Salmonella enterica</i> Typhimurium	C20
		<i>Serratia marcescens</i>	7145
		<i>Shigella sonnei</i>	ATCC 25931

Table 2. Phytochemical screening of the aqueous extract of *K. pinnata* leaves.

Secondary metabolites	Presence in the extract
Flavonoids ¹	+
Alkaloids ²	-
Gaponins	+
Phenols ³	+
Tannins ³	+

+ = presence of the compound, - = absence of the compound, ¹Test for flavones, flavonols and xanthones, ²Tests with reactive of Meyer and Bouchardat, ³Test with alcoholic solution of ferric perchlorate.

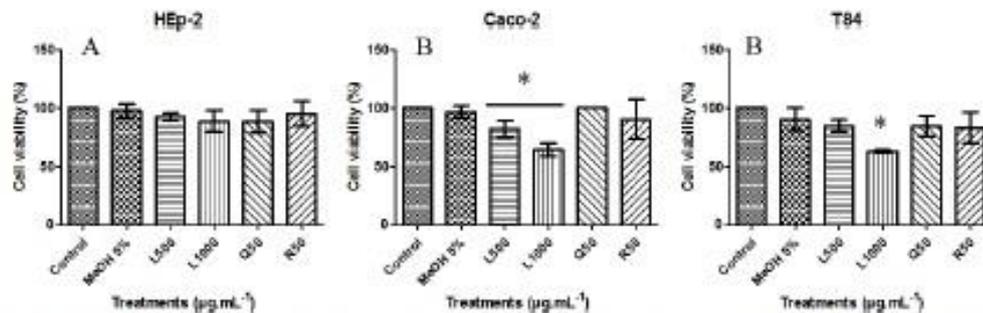


Figure 1. Cytotoxicity of aqueous extracts of leaves and flavonoids occurring in *Kalanchoe pinnata* after 24 h of culture at 37 and 5% CO₂. A - HEp-2; B - Caco-2; C - T84. L = leaf extract, Q = quercetin, R = rutin, * = statistically different at the Bonferroni test (p<0.05).

(EAEC 042) was altered when grown in the presence of aqueous extract of leaves from *K. pinnata* and quercetin (Figure 2). Although not express inhibiting the growth of

this strain in the macrodilution assay (Table 3), the aqueous extracts of the leaves were able to reduce the formation of biofilms of the EAEC 042 exceeding 50%.

Table 3. Bacterial growth in the presence of flavonoids quercetin and rutin and aqueous extracts of leaves ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) of *K. pinnata*.

Strain	L 1000	RU 10	Q 10	MeOH 1%	RU 100	Q 100	MeOH 10%
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 27853)	-	R	R	-	R*	I*	R*
<i>C. freundii</i> (ATCC 12241)	R	R	R	-	R*	I*	R*
Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC 17-2)	-	-	R	-	R*	I*	R*
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	-	-	-	-	R*	I*	R*
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	-	-	-	-	R*	I*	R*
<i>S. marcescens</i> (7145)	-	-	R	-	R	I	-
<i>S. simulans</i> (ATCC 27851)	-	-	-	-	R	I	-
<i>B. thuringiensis</i> (ATCC 33679)	R	-	R	-	R	I	-
<i>S. saprophyticus</i> (ATCC 15305)	-	-	-	-	R	I	-
<i>S. enterica</i> Typhimurium (C20)	-	-	-	-	R	I	-
<i>E. faecalis</i> (29212)	-	-	-	-	R	I	-
<i>E. coli</i> K-12 (C600)	-	-	-	-	R	I	-
<i>S. sonnei</i> (ATCC 25931)	R	-	-	-	R	I	-
<i>E. coli</i> (ATCC 35218)	-	-	-	-	R	I	-
<i>S. pyogenes</i> (8668)	-	-	-	-	I	I	-
<i>E. coli</i> K-12 (HB 101)	R	-	-	-	R	I	-
<i>K. pneumoniae</i> (ATCC 700603)	-	-	-	-	R	I	-
Enteroaggregative <i>E. coli</i> (EAEC 042)	-	-	-	-	R	I	-

L = Leaf extract; RU = rutin; Q = quercetin; R = reduction; I = inhibition; trace = similar growth to the control in MHA. * = Unvalidated for the possible influence of the solvent.

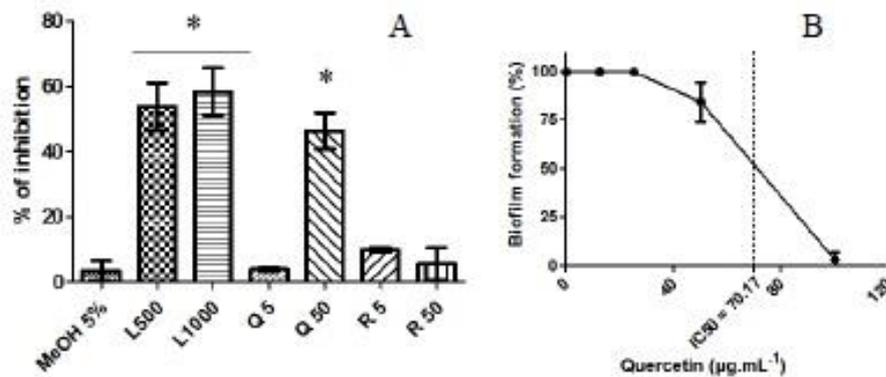


Figure 2. Biofilm formation of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC 042). A, Activity of aqueous extracts of leaves and flavonoids occurring in *Kalanchoe pinnata* ($\mu\text{g.mL}^{-1}$) after 18 h of cultivation at 37°C. B, Inhibitory concentration of quercetin at 50% of biofilm formation. L = leaf extract, R = Rutin, Q = Quercetin. * = values are statistically different from the control to the Bonferroni test ($p < 0.05$).

This reduction was observed in both tested concentrations (500 and 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$).

At the highest concentration tested (50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), quercetin was able to reduce biofilm formation. For this compound, the inhibitory concentration for 50% of biofilm formation (IC50) was 70.17 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. However, no inhibition was observed in the cultivation in the presence

of rutin at concentrations of 5 or 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

DISCUSSION

The HEp-2 strain was resistant to the presence of the aqueous extract of *K. pinnata* in cultivation, which

was not observed for the other cell lines. The phytochemical analysis revealed the presence of flavonoids in this extract. Once cytotoxicity was not observed to any lineage to the flavonoids quercetin and rutin, the toxicity observed in the leaf extract may not be related to the free flavonoids present in the plant.

The cytotoxic activity of extracts of the species has been attributed to compounds called bufadienolides. These are characteristically present in leaves and stems of *K. pinnata*, being demonstrated high cytotoxicity in human carcinoma lines, especially the compounds bryoflin B and bryoflin A (Milad et al., 2014). The presence of these compounds in the assessed aqueous extract may be related to the sensitivity observed in Caco-2 and T84 lines. This metabolite group can be considered the largest in this activity for this species, also having potential for chemoprevention of cancer (Supratman et al., 2001).

The aqueous extract of leaves showed a reduction in the growth of four of the evaluated strains. The antibacterial activity of aqueous extracts of *K. pinnata* leaves was also observed in *Propionibacterium acnes* (Kumar et al., 2013), *Alcaligenes faecalis* and *Bacillus subtilis* (Sharma et al., 2014).

As observed for the aqueous extract, *in vitro* studies have demonstrated the antibacterial activity of methanolic extracts of *K. pinnata* leaves. This action is observed in strains of genres evaluated in this study, as *E. faecalis* (Albinu et al., 2007) *E. coli* (Pattewar et al., 2013), *K. pneumoniae* (Okwu and Nhamdi, 2011), *P. aeruginosa* (Tatsimo et al., 2012), *S. typhi* (Nwadinigwe, 2011), *S. dysenteriae* (Akinpelu, 2000), and *S. aureus* (Biswas et al., 2011).

The antibacterial activity in *S. marcescens* was also observed in methanolic extracts of the plant (Sharma et al., 2014). In this work, the reduction and inhibition activities of this strain were observed only when grown in the presence of quercetin. The flavonoid may be one of the active principles present in methanolic plant extracts, since it shows high solubility in methanol (Megawati and Fajriah, 2013).

Quercetin has noted antibacterial activity at concentrations above $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ being able to inhibit the growth of all the strains tested in this study. Besides these strains, quercetin also presents antibacterial activity in strains of *Proteus mirabilis*, *Achromobacter baumannii*, *Helicobacter pylori* and also methicillin resistant *S. aureus* (MRSA) when evaluated alone or in combination with oxacillin (Ramos et al., 2006, Ozcelik et al., 2006).

Also present in *K. pinnata* extracts, rutin demonstrated antibacterial activity for all tested strains. The most significant result for this flavonoid was held at the concentration of $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, with the reduction of all tested strains. In some strains, like *E. coli* and *S. aureus*, the minimum inhibitory concentration for rutin is presented in amounts exceeding $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Aruna

et al., 2012). This shows the lack of inhibitory activity in low concentrations of rutin, as well as $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, evaluated in this study.

The antibacterial activity of aqueous extract of leaves of the species may also be related to the presence of other compounds derived from plant secondary metabolism, such as saponins, phenols and tannins, present in the extract evaluated in this study (Table 2).

The antibacterial activity of saponins isolated from plant extracts has been demonstrated in strains of *E. coli*, *B. subtilis* and others, as well as antifungal activity (Edewor et al., 2009, Kannabiran et al., 2009, Maataiah et al., 2012). Similarly, tannins and hydrolyzed tannins are active against the growth of *E. coli*, *B. subtilis*, *B. cereus* and *B. licheniformis*, *Shigella boydii*, *S. flexneri* and others, yeasts and fungi (Banso and Adeyemo, 2007, Lim et al., 2006). Antimicrobial activity of phenolic compounds, such as phenolic acids and coumarins, was observed in strains of *E. coli*, *Bacillus cereus* and fungi (Nohynek et al., 2006, Niteema et al., 2012). The increase and the effectiveness of antibacterial activity of derivatives of phenolic acids are usually related to increasing the alkyl chain in the molecule, also the butyl ester regions being effective (Merki et al., 2010).

Some phytochemical compounds have the ability to control the establishment and growth of bacterial biofilms. These compounds may act at different stages of biofilm formation, such as in bacterial adhesion, motility and "quorum-sensing", and have the advantage of having a lower probability of bacterial resistance (Borges et al., 2013). Besides acting in antimicrobial activity, plant extracts can be the basis for the synthesis of active compounds. *K. pinnata* leaf extracts can be used for the synthesis of silver nanoparticles with antibacterial and antibiofilm activity in *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. pyogenes* and *Salmonella enterica* Typhi. This activity proves to be higher than that observed for ciprofloxacin (Phatak and Hendre, 2016).

As observed for EAEC, quercetin also shows antibiofilm activity to *S. aureus*, observed in *in vitro* assays. This quercetin in plant extracts is able to act in the repression of bacterial genes of cell adhesion and reduces the hemolytic capacity of *S. aureus*, being suggested for use in inhibiting the formation of recalcitrant biofilms (Lee et al., 2013).

It can be concluded that flavonoids, like quercetin, are active principles of the extracts of *Kalanchoe pinnata* for antibacterial activity. Thus, phytochemical studies aimed at the research and isolation of flavonoids of the species are promising in the search for new antimicrobial agents.

Conclusion

The aqueous extract of *K. pinnata* leaves at low concentrations and the flavonoids quercetin and rutin

showed no cytotoxicity in tested concentrations. The evaluated material presented antibacterial activity to various strains and potential to inhibit the formation of biofilms of EAEC D42. Quercetin must be considered as one of the active substance of interest responsible for the antibacterial activity.

Conflicts of Interests

The authors have not declared any conflict of interests.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro (FAPERJ), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

REFERENCES

- Abdel-Aziz SM, Aeron A (2014). Bacterial biofilm: dispersal and inhibition strategies. *SAJ Biotechnol* 1:1-10.
- Albinu IE, Odunayo RA, Adenipekun T, Adelowotan T, Odugbeni T (2007). *In vitro* antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe ornata*. *Afr. J. Tradit. Complement. Altern. Med.* 4(3):338-44.
- Aldape DA (2000). Antimicrobial activity of *Bryophyllum pinnatum* leaves. *Fitoterapia* 71:193-194.
- Aruna MKA, Brito SA, Morais-Braga MFB, Santos KKA, Souza TM, Leite TR, Costa JGM, Couzinho HDM (2012). Evaluation of antibiotic & antibiotic modifying activity of plicocarpine & rutin. *Indian J. Med. Res.* 135:252-254.
- Barso A, Adeyemo SO (2007). Evaluation of antibacterial properties of tannins isolated from *Dichrostachys cinerea*. *Afr. J. Biotechnol.* 6:1785-1787.
- Barbosa WLR (2001). Manual para análise fitoquímica e cromatográfica de extratos vegetais. *Rev. Ciênc. UFPA* 4:12-18.
- Berry AA, Yang Y, Pakhanukova N, Garnett JA, Lee W, Cota E, Marchant J, Roy S, Tuttila M, Liu B, Inman KG, Ruiz-Peretz F, Mandomando I, Nataro JP, Zavalov A, Matthews S (2014). Structural insight into host recognition by aggregative adherence fimbriae of enteroaggregative *Escherichia coli*. *PLoS Pathogens* 10:1-15.
- Bewas SK, Chowdhury A, DAS J, Kamakar UK, Shil MC (2011). Assessment of cytotoxicity and antibacterial activities of ethanolic extracts of *Kalanchoe pinnata* Linn. (family: Crassulaceae) leaves and stems. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 2:2605-2609.
- Borges A, Abreu AC, Matheo J, Saavedra MJ, Simões M (2013). Biofilm prevention and control by dietary phytochemicals. In: Mendez-Vilas A (Ed.), *Microbial pathogens and strategies for combating them: science, technology and education*. Formatex Research Center, Badajoz, pp. 32-41.
- Bueno J (2014). Anti-biofilm drug susceptibility testing methods: looking for new strategies against resistance mechanism. *J. Microbial Biochem. Technol.* 1:1-9.
- Edewor TI, Ibiokunle GJ, Usman LA (2009). Phytotoxic and antimicrobial screening of saponin isolated from ethanolic leaf extract of *Xylocarpus aethiopicus*. *Sol. Focus* 14:507-512.
- Gatto MT, Falcochito S, Grippo E, Mazzanti G, Battinelli L, Nicolai G, Lambiada D, Saso L (2002). Antimicrobial and Anti-Ubiquitin Activity of Quercetin and Its C2-C16 3-O-Acyl- Esters. *Bioorg. Med. Chem.* 10:269-272.
- Kannabiran K, Mohankumar T, Gunaseker V (2009). Evaluation of antimicrobial activity of saponin isolated from *Solanum xanthocarpum* and *Cenchrus asiaticus*. *Int. J. Nat. Eng. Sci.* 3(1):22-25.
- Kumar S, Malik DK, Kumar R (2013). Antimicrobial effects of *Mangifera indica*, *Bombax ceiba*, *Syzygium cumini* and *Kalanchoe pinnata* against acne-inducing bacteria. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 4:645-647.
- Lee JH, Park JH, Cho HS, Joo SW, Cho MH, Lee J (2013). Anti-biofilm activities of quercetin and tannic acid against *Staphylococcus aureus* biofouling. *Biofouling* 29:491-499.
- Lim SH, Darah I, Jain K (2006). Antimicrobial activities of tannins extracted from *Rhizophora apiculata* barks. *J. Trop. Forest. Sci.* 18:59-65.
- Lopes RM, Oliveira TT, Nagem TJ, Pinto AS (2000). Flavonoides. *Biocic. Ciênc. Des.* 17:18-22.
- Maatallah MB, Bouzidi NK, Bellahouel S, Merah B, Fortas Z, Soulimani R, Saidi S, Derdour A (2012). Antimicrobial activity of the alkaloids and saponin extracts of *Anabasis articulata*. *J. Biotechnol. Pharm. Res.* 3:54-57.
- Majaz QA, Talya AU, Khushid M, Nazim S, Sraij S (2011). The miracle plant (*Kalanchoe pinnata*): A phytochemical and pharmacological review. *Int. J. Res. Ayurveda Pharm.* 2(5):1478-1482.
- Megawati AD, Fajriah S (2013). 3',4'-Dimethoxy Quercetin, a flavonoid compound isolated from *Kalanchoe pinnata*. *J. Appl. Pharm. Sci.* 3:86-90.
- Merkl R, Hradkova I, Filip V, Smidral J (2010). Antimicrobial and antioxidant properties of phenolic acids alkyl esters. *Czech J. Food Sci.* 28:275-279.
- Milad R, El-Ahmady S, Singab AN (2014). Genus *Kalanchoe* (Crassulaceae): a review of its ethnomedicinal, botanical, chemical and pharmacological properties. *Eur. J. Med. Plants* 4:86-104.
- Mittal AK, Kumar S, Banerjee UC (2014). Quercetin and gallic acid mediated synthesis of bimetallic (silver and selenium) nanoparticles and their antitumor and antimicrobial potential. *J. Colloid Interface Sci.* 431:194-9.
- Muzitano MF, Tinoco LW, Guette C, Kaiser C, Rossi-Bergmann B, Costa SS (2006). The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry* 67:2071-2077.
- Muzitano MF, Bergonzi MC, De Melo GO, Lage CLS, Billa AP, Vindict FF, Rossi-Bergmann B, Costa SS (2011). Influence of cultivation conditions, season of collection and extraction method on the content of antileishmanial flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *J. Ethnopharmacol.* 133:132-137.
- Namasivayan SKR, Roy EA (2013). Antibiofilm effect of medicinal plant extracts against clinical isolate of biofilm of *Escherichia coli*. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 5:486-489.
- Ntlima LW, Savadogo A, Simpore J, Dianou D, Traore AS (2012). *In vitro* antimicrobial activity of some phenolic compounds (coumarin and quercetin) against gastroenteritis bacterial strains. *Int. J. Microbiol. Res.* 3:183-187.
- Nohynek LJ, Alakomi HL, Kahkonen MP, Heinonen M, Helander IM, Okaman-Caldentey KM, Puupponen-Piiria RH (2006). Berry phenolics: antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. *Nutr. Cancer* 54:18-32.
- Nwadinigwe AG (2011). Antimicrobial activities of methanol and aqueous extracts of the stem of *Bryophyllum pinnatum* (Crassulaceae). *Afr. J. Biotechnol.* 10:16342-16346.
- Olowu ED, Niamdi UF (2011). A novel antimicrobial phenanthrene alkaloid from *Bryophyllum pinnatum*. *J. Chem.* 8(3):1456-1461.
- Oliveira LFG, Gilbert B, Villas Bôas GK (2013). Oportunidades para inovação no tratamento da leishmaniose usando o potencial das plantas e produtos naturais como fontes de novos fármacos (Opportunities for innovation in the treatment of leishmaniasis using the potential of plants and natural products as sources of new drugs). *J. Flite Electron.* 8(1):33-41.
- Ozcelik B, Orhan I, Toker G (2006). Antiviral and antimicrobial assessment of some selected flavonoids. *Z. Naturforsch* 61:632-638.
- Phatak RS, Hendre A (2016). Green synthesis of silver nanorods using aqueous extract of *Kalanchoe pinnata* fresh leaves and its synergistic effect with ciprofloxacin and antibiofilm activities. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 8:168-174.

- Pattewar SV, Padi DN, Dahikar SB (2013). Antimicrobial potential of extract from leaves of *Kalanchoe pinnata*. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 4:4577-4580.
- Prasad VGNV, Krishna BV, Swamy PL, Rao TS, Rao GS (2014). Antibacterial synergy between quercetin and polyphenolic acids against bacterial pathogens of fish. *Asian Pac. J. Trop. Dis.* 4:326-329.
- Rahman AE, Moineddin M, Molla M, Worku A, Huff L, Kirwood B, Mohan SB, Mazumder S, Bhutta Z, Raza F, Mrema S, Mesanja H, Kadobera D, Waswa P, Bahi R, Zangenberg M, Muhe L (2014). Childhood diarrhoeal deaths in seven low- and middle-income countries. *Bull. World Health Organ.* 92:664-671.
- Ramos FA, Takaiashi Y, Shirotori M, Kawaguchi Y, Tsuchiya K, Shibata H, Higuti T, Tadokoro T, Takeuchi M (2006). Antibacterial and antioxidant activities of quercetin oxidation products from yellow onion (*Allium cepa*) skin. *J. Agric. Food Chem.* 54:3551-3557.
- Sharma A, Bhat M, Chandra N (2014). *In vitro* antibacterial and antioxidant activity of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* 6:558-560.
- Soberon JR, Sgariglia MA, Sampietro DA, Quiroga EN, Vattuone MA (2007). Antibacterial activity of plant extracts from northwestern Argentina. *J. Appl. Microbiol.* 102:1450-1461.
- Tapas AR, Sakrkar DM, Kakde RB (2008). Flavonoids as nutraceuticals: a review. *Trop. J. Pharm. Res.* 7:1089-1099.
- Tablino SJN, Tamokou JD, Havyarimana I, Ceupor D, Forgo P, Hohmann J, Kulate JR, Tane P (2012). Antimicrobial and antioxidant activity of kaempferol rhamnoides derivatives from *Bryophyllum pinnatum*. *BMC Res. Notes* 5:1-6.