

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CÂMPUS DE ARARAQUARA

***KALANCHOE GASTONIS-BONNIERI* RAYM.-HAMET & H.
PERRIER E *KALANCHOE PINNATA* PERS. (CRASSULACEAE):
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ESTUDO
FARMACOGNÓSTICO COMPARATIVO**

VICTOR HUGO PELLA LEGRAMANDI

Farmacêutico-Bioquímico

ARARAQUARA - SP

2011

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JULIO DE MESQUITA FILHO"
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

***KALANCHOE GASTONIS-BONNIERI* RAYM.-HAMET & H.
PERRIER E *KALANCHOE PINNATA* PERS. (CRASSULACEAE):
ATIVIDADE ANTIFÚNGICA E ESTUDO
FARMACOGNÓSTICO COMPARATIVO**

VICTOR HUGO PELLA LEGRAMANDI

ORIENTADOR: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

ARARAQUARA – SP
2011

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

L517k Legramandi, Victor Hugo Pella
Kalanchoe gastonis-bonnieri Raym.-Hamet & H.Perrier e *Kalanchoe Pinnata* Pers. (Crassulaceae): atividade antifúngica e estudo farmacognóstico comparativo / Victor Hugo Pella Legramandi. – Araraquara, 2011
62 f. + il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Luis Vitor Silva do Sacramento

1. *Kalanchoe*. 2. Anatomia. 3. Histoquímica. 4. Controle de qualidade. 5. Triagem fitoquímica. 6. *Candida*. 7. *Cryptococcus*. I. Sacramento, Luis Vitor Silva do, orient. II. Título.

CAPES: 4030005

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus pais, Sérgio e Giselle, pelo amor com que me educaram e trabalharam todos esses anos para que eu tivesse a oportunidade de realizar todos os meus sonhos e, principalmente, por ensinarem que a cada dia devemos ter sonhos novos já que eles serão a motivação para continuarmos crescendo em nossa jornada rumo à felicidade.

Dedico, ainda, ao meu irmão Octávio, por ter me ensinado desde sempre o quanto é importante ter um companheiro e amigo para ajudar nessa jornada e, com seu bom humor e alegria, ter me mostrado que muitas vezes os únicos remédios necessários são atenção e carinho.

A vocês, muito obrigado por me amarem tanto!

Agradecimentos

Agradeço a Deus pelo dom da Vida e pelas diversas vezes em que se manifestou com seu Amor me guiando nas diversas encruzilhadas e dificuldades;

Ao Professor Luis Vitor, pela sua dedicação e paciência em ensinar, pelos conselhos sábios e puxões de orelha que só um pai pode dar aos seus filhos, pela amizade de todos os dias e pela alegria de me deixar fazer parte de sua equipe de trabalho desde meu primeiro ano de graduação;

À minha companheira, Josiane, muito obrigado pelo incentivo e apoio às minhas decisões, pelos momentos de felicidade, alegria, pelo companheirismo, longas conversas, presentes, por me ensinar tanto e por me deixar fazer parte da sua vida e principalmente por estarmos sempre juntos, não importa a distância. Te amo demais!

À minha família, em especial aos meus avós Antônio, Marísia, Santo e Lourdes, por serem sempre um porto seguro e me acolherem tão bem em suas casas. Muito obrigado principalmente pela formação de uma família tão unida e amada!

Aos Professores Doutores Sergio Ricardo Ambrósio e Taís Maria Bauab pelas excelentes contribuições durante o Exame Geral de Qualificação; às Professoras Doutoradas Ana Marisa Fusco Almeida e Adriana Lenita Meyer Albiero, pelas recomendações recebidas durante a Defesa da Dissertação. A todos vocês, muito obrigado pelo incentivo para a continuidade do trabalho;

À Angélica, pelo carinho e amor com que atende a todos que buscam sua ajuda no Laboratório de Botânica e por muitas vezes ser minha mãe em Araraquara. Seus conselhos são e sempre serão bem-vindos;

Aos Professores Doutores André Gonzaga dos Santos e Ana Marisa Fusco Almeida por abrirem as portas de seus laboratórios para que eu pudesse realizar os

experimentos e principalmente pela ajuda no entendimento de conceitos e resultados, tão bem elucidados por ambos;

Aos amigos do Laboratório de Farmacognosia, pela harmoniosa convivência e prontidão com que sempre me ajudavam;

Aos novos amigos do Laboratório de Micologia Clínica, pela receptividade e por me deixarem à vontade para trabalhar, e em especial à Fernanda que dedicou seu tempo e sua atenção para me ensinar e ajudar. Tenho certeza que será uma excelente professora;

Aos grandes amigos do Laboratório de Botânica, que tanto influenciaram em minha formação como Farmacêutico. Aline, Allynson, Andréa, Camila, Célio, Danila, Débora, Eleonora, Emi, Juhan, Juliana Severi, Juninho, Larissa, Luis Antonio, Mariana, Marília, Maurício, Nestor, Rodolfo, Stephanie, cada um de vocês tem um lugar especial em meu coração!

Aos amigos da Graduação, difícil nomear todos, mas em especial ao Rodolfo, Victor e Marco Antonio, por serem amigos em todas as horas, e por me ensinarem a importância do trabalho em equipe, cada um com suas virtudes, complementando a qualidade dos demais. Saudades dos bons momentos!

Aos professores da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, pelos conhecimentos tão bem transmitidos;

À Capes pela bolsa concedida e pela aquisição do microscópio de captura de imagens junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e, à Diretoria da FCF pelo apoio na adequação do Laboratório Multiusuário de Microscopia destinando recursos da Reserva Técnica Institucional FAPESP.

Sumário

	Página
1. Introdução	11
2. Revisão da Literatura	12
3. Objetivos	16
3.1. Objetivos gerais	16
3.2. Objetivos específicos	16
Capítulo 1. Estudo anatômico e histoquímico das folhas de <i>Kalanchoe gastonis-bonnierei</i> Raym.-Hamet & H. Perrier e de <i>Kalanchoe pinnata</i> Pers	17
1. Introdução	18
2. Objetivos	18
3. Materiais e métodos	18
3.1. Obtenção do material vegetal	18
3.2. Estudo anatômico	19
3.3. Estudo histoquímico	20
4. Resultados e discussão	21
4.1. Estudo anatômico	21
4.2. Estudo histoquímico	25
5. Conclusão	29
Capítulo 2. Estudo farmacognóstico das folhas de <i>Kalanchoe gastonis-bonnierei</i> e de <i>Kalanchoe pinnata</i> e avaliação da atividade antifúngica de diferentes extratos destas espécies vegetais	30
1. Introdução	31
2. Objetivos	32
3. Materiais e métodos	33
3.1. Obtenção do material vegetal	33
3.2 - Determinação das características físico-químicas do pó das folhas	33
3.2.1. Análise granulométrica	33
3.2.2. Determinação da densidade aparente das folhas secas pulverizadas	33
3.2.3. Determinação do resíduo sólido do vegetal fresco	34
3.2.4. Determinação da perda por dessecação	34
3.2.5. Determinação do valor pH	34
3.2.6. Determinação do teor de cinzas totais	34
3.2.7. Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido	35
3.2.8. Determinação do teor de extrativos	35

3.3. Triagem fitoquímica preliminar	35
3.3.1. Saponinas	35
3.3.2. Taninos	36
3.3.3. Flavonoides	36
3.3.4. Antraquinonas	36
3.3.5. Glicosídeos cardiotônicos	37
3.3.6. Alcaloides	37
3.3.7. Cumarinas	37
3.3.8. Metilxantinas	38
3.4. Cromatografia em camada delgada	38
3.4.1. Obtenção dos extratos e frações	38
3.4.2. Técnicas cromatográficas	38
3.5. Determinação da atividade antifúngica	39
3.5.1 - Seleção e Cultivo das linhagens de leveduras	39
3.5.2. Preparo das substâncias vegetais.	40
3.5.3. Avaliação da atividade antifúngica	40
4. Resultados e discussão	41
4.1. Determinação das características físico-químicas do pó das folhas	41
4.2. Triagem fitoquímica preliminar	44
4.3. Cromatografia em camada delgada	45
4.4. Determinação da atividade antifúngica	49
5. Conclusão	53
4. Considerações finais	54
5. Referência bibliográfica	55

Lista de Figuras

Figura		Página
1	Exemplar florido de <i>Kalanchoe pinnata</i> Pers	13
2	Exemplares de <i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i> Raym-Hamet & H. Perrier	14
3	Fotomicrografias de aspectos anatômicos de folhas de <i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i>	23
4	Fotomicrografias de aspectos anatômicos de folhas de <i>Kalanchoe pinnata</i>	24
5	Fotomicrografias mostrando detalhes dos testes histoquímicos realizados em folhas de <i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i>	27
6	Fotomicrografias mostrando detalhes dos testes histoquímicos realizados em folhas de <i>Kalanchoe pinnata</i>	28
7	Montagem da micro-placa para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos e frações de <i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i> e <i>Kalanchoe pinnata</i>	41
8	Distribuição do tamanho das partículas da droga vegetal obtida de folhas de <i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i>	43
9	Distribuição do tamanho das partículas da droga vegetal obtida de <i>Kalanchoe pinnata</i>	43
10	Determinação da presença de metabólitos secundários em <i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i> por cromatografia em camada delgada	47
11	Determinação da presença de metabólitos secundários em <i>Kalanchoe pinnata</i> por cromatografia em camada delgada	48
12	Placa cromatográfica contendo as frações hexano, acetato de etila, <i>n</i> -butanol e aquosa de <i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i> e as frações <i>n</i> -hexano, acetato de etila, <i>n</i> -butanol, aquosa e etanólica de <i>Kalanchoe pinnata</i> , revelada com vanilina sulfúrica	49

Lista de Tabelas

Tabela		Página
1	Determinação do perfil histoquímico das espécies <i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i> Raym-Hamet & H. Perrier e <i>Kalanchoe pinnata</i> Pers	26
2	Fase móvel e reagentes utilizados para determinação de metabólitos secundários utilizando-se técnica de cromatografia em camada delgada	39
3	Parâmetros físico-químicos de qualidade das drogas vegetais obtidas a partir de folhas de <i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i> e <i>Kalanchoe pinnata</i>	42
4	Triagem fitoquímica preliminar das drogas vegetais originadas de <i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i> e de <i>Kalanchoe pinnata</i>	44
5	Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima ($\mu\text{g/mL}$) do extrato bruto de <i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i> e suas frações <i>n</i> -hexano, acetato de etila, <i>n</i> -butanol e aquosa	51
6	Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato bruto de <i>Kalanchoe pinnata</i> e suas frações <i>n</i> -hexano, acetato de etila, <i>n</i> -butanol, aquosa e etanólica	51

Resumo

Crassulaceae apresenta interesse para estudos pois atende às diversas abordagens de estudos de prospecção (etológica, quimiotaxonômica e etnodirigida). Pouco se estudou sobre a distinção das espécies de *Kalanchoe* que podem ser confundidas, contribuindo para o risco de intoxicações. A falta de opções terapêuticas para o tratamento de micoses, o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos tradicionais e sua toxicidade indicam a necessidade do estudo de novas substâncias ativas, das quais as plantas historicamente são fornecedoras. Visou-se à caracterização anatômica, histoquímica, físico-química e fitoquímica preliminar de *Kalanchoe gastonis-bonnieri* e *Kalanchoe pinnata* para contribuir com sua identificação e avaliar a atividade antifúngica contra cepas ATCC de *Candida* (*C. albicans* 90028, *C. parapsilosis* 22019, *C. krusei* 6258, *C. tropicalis* 750 e *C. glabrata* 90030) e *Cryptococcus neoformans* 90012). O estudo anatômico revelou grande semelhança entre as plantas, que diferiram quanto à distribuição de compostos fenólicos na nervura central. O parênquima clorofiliano é homogêneo, com epiderme uniestratificada de células tabulares e tricomas glandulares claviformes, bisseriados na cabeça e no pedúnculo. No estudo histoquímico distingue-se *K. gastonis-bonnieri* de *K. pinnata* por esta apresentar antocianinas e a primeira apresentar esteroides, ambas apresentaram alcaloides, compostos fenólicos, taninos e terpenoides com grupo carbonila. Na triagem fitoquímica e técnicas cromatográficas, confirmaram-se os resultados da histoquímica e identificou-se glicosídeos cardiotônicos em *K. pinnata*. A caracterização físico-química auxiliou na determinação dos parâmetros de qualidade para a elaboração de monografias das drogas vegetais. Os testes de atividade antifúngica mostraram que *K. pinnata* é mais ativa que *K. gastonis-bonnieri*, sendo *C. neoformans*, *C. glabrata* e *C. parapsilosis* as cepas mais afetadas. A fração acetato de *K. gastonis-bonnieri* foi a mais ativa, com CIM de $31,25\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *C. neoformans* e *C. glabrata*, apresentando, ainda, CIM e CFM contra *C. parapsilosis* ($62,5\mu\text{g mL}^{-1}$). Já para *K. pinnata*, a fração etanólica foi a mais ativa, CIM variando entre 0,49 e $15,625\mu\text{g mL}^{-1}$. As demais frações apresentaram CIM entre $1,95$ e $125\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando forte atividade fungistática.

Palavras-chave: *Kalanchoe*, Anatomia, Histoquímica, Controle de Qualidade, Triagem Fitoquímica, *Candida*, *Cryptococcus*.

Abstract

Crassulaceae is an interesting family to study because it meets the diverse approaches to prospection studies. There are few studies about differences between species of *Kalanchoe* so they could be confused, increasing the risk of intoxication. In addition, lack of options to treat diseases caused by yeasts and the appearance of species that no longer are susceptible to traditional drugs and toxicity of these drugs suggests that studies are necessary to find new active substances that can be found in plants. Aim of this study was anatomical, histochemical, physical-chemical and phytochemical characterization of *Kalanchoe gastonis-bonnierii* and *Kalanchoe pinnata* to contribute with their identification and to evaluate their activity against ATCC strains of *Candida* (*Candida albicans* 90028, *Candida parapsilosis* 22019, *Candida krusei* 6258, *Candida tropicalis* 750 and *Candida glabrata* 90030) and *Cryptococcus neoformans* 90012. Anatomical study showed great similarity between both *Kalanchoe* differing in the distribution of the phenolic compounds through the central nerve. Chlorophyllous parenchyma is homogeneous with uniseriate epidermis of tabular cells and glandular trichomas in a club shape and biseriated head and peduncle. *K. gastonis-bonnierii* showed steroids and *K. pinnata* antocianins in histochemical study, and both of them showed alkaloids, phenolic compounds, tannins and terpenoids with carbonyl groups. Phytochemical and chromatography studies confirmed the results of histochemistry and cardioactive glicosydes were identified in *K. pinnata*. Physical-chemical characterization contributed to determine quality parameters to elaborate monographies for these medicinal herbs. Antifungal activity tests showed that *K. pinnata* is the most active, being *C. neoformans*, *C. glabrata* and *C. parapsilosis* the most affected strains. The best activity of *K. gastonis-bonnierii* were obtained with the acetate fraction, being $31,25\mu\text{g mL}^{-1}$ the MIC against *C. neoformans* and *C. glabrata*, showing activity against *C. parapsilosis* too (MIC and MFC= $62,5\mu\text{g mL}^{-1}$). The most active fraction of *K. pinnata* was the ethanolic one, MIC varying between 0,49 and $15,625\mu\text{g mL}^{-1}$. The other fractions had MIC between 1,95 and $125\mu\text{g mL}^{-1}$, which corresponds to a strong fungistatic activity.

Keywords: *Kalanchoe*, Anatomy, Histochemistry, Quality Control, Phytochemical Trial, *Candida*, *Cryptococcus*.

1. Introdução

Drogas vegetais são definidas como plantas medicinais ou suas partes que contenham substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processos de colheita, estabilização e secagem, podendo ser íntegra, rasurada ou triturada (BRASIL, 2010).

O governo brasileiro reconhece a utilização das plantas medicinais como uma forma de terapêutica eficaz e segura, recomendando o seu uso com a publicação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (BRASIL, 2006b) e da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006a).

Desta forma, a utilização de plantas medicinais deve ser baseada em estudos científicos que garantam sua segurança e eficácia através de testes *in vitro* e/ou *in vivo*, já que o uso incorreto pode acarretar em intoxicações e agravos à saúde (VEIGA-JÚNIOR et al, 2005).

Esse trabalho procurou distinguir duas das espécies de *Kalanchoe*, as quais estão sendo utilizadas pela população no tratamento de diversas enfermidades. Esta distinção foi conduzida estudando-se a morfo-anatomia das folhas, sendo observadas suas características macro e microscópicas. Realizaram-se também vários testes de caracterização farmacognóstica (histoquímicos e químicos). Como prosseguimento do estudo avaliou-se a atividade antifúngica dessas duas espécies, considerando o número de classes de antifúngicos ser restrito, pois atualmente, os profissionais da saúde podem contar apenas com antibióticos, azóis, antimetabólitos, alilaminas e equinocandinas. Tais medicamentos atuam impedindo a síntese de ergosterol, criando poros na membrana, impedindo a síntese de ácido nucléico e a formação da parede celular dos fungos (PRASAD & KAPOOR, 2005; SILVA, 2006).

A morbi-mortalidade provocada por infecções fúngicas tem crescido. Isso se deve à utilização de medicamentos imunossupressores e do crescente número de casos de indivíduos contaminados com HIV, além de indivíduos submetidos a processos invasivos, como aqueles que requerem a utilização de catéteres ou internação em unidades de terapia intensiva (FRIDKIN & GAYNES, 1999; MONTRAVERS & JABBOUR, 2006). Por essa razão, é de suma importância o estudo de novas moléculas que possam ser úteis neste ramo da terapêutica (PRASAD & KAPOOR, 2005).

2. Revisão da Literatura

Para explorar o potencial terapêutico de fontes naturais, diversas metodologias podem ser utilizadas, dentre as quais são citadas: abordagem randômica (na qual há coleta aleatória de espécies vegetais para estudo), etológica (utilizando-se a observação dos animais e suas relações com as espécies vegetais quando apresentam alguma doença), quimiotaxonômica (estuda-se uma espécie de uma família na qual já se tem estudos comprovando a presença de princípios ativos de interesse em pelo menos mais uma espécie dessa família) e a abordagem etnodirigida (que avalia os usos e saberes tradicionais em relação a determinadas espécies) (SILVA & CECHINEL FILHO, 2002; ALBUQUERQUE & HANAZAKI, 2006).

Crassulaceae abrange 30 gêneros e 1400 espécies cosmopolitas, sendo que essas espécies apresentam ampla utilização como plantas ornamentais. São plantas herbáceas ou sub-lenhosas, que podem atingir até um metro de altura, principalmente durante sua floração. Suas folhas são suculentas, ovaladas ou obovadas, de margem ondulada a sub-crenada ou, ainda, crenada e filotaxia oposta cruzada ou alterna. Podem apresentar idioblastos cristalíferos contendo areias cristalinas (LORENZI & MATOS, 2002). O fruto é do tipo folículo e suas sementes apresentam endosperma (BARROSO, 1991). As flores são actinomorfas, contendo sépalas que podem ser livres e, corola tubulosa ou não (sendo este um caractere diferencial para a determinação dos gêneros), possui o número de carpelos igual ao número de pétalas e sépalas. As plantas são originadas, em sua maioria, de Madagascar e África Continental (TILLSON, 1940; BARROSO, 1991). Podem ser encontradas espécies com folhas glabras, ou ainda que apresentem tricomas tectores ou tricomas glandulares (WERYSZCO-CHMIELEWSKA & CHERNETSKYY, 2005).

Espécies como *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. (Figura 1), *Kalanchoe daigremontiana x tubiflora*, *Kalanchoe brasiliensis* Camb. e *Kalanchoe gastonis-bonnieri* Raym.-Hamet & H. Perrier (Figura 2) são fontes de diversas classes de metabólitos secundários já descritos, sendo que alguns são de interesse comercial, tais como: bufadienólídeos (usados como anti-tumorais e inseticidas), dimalato de kalanchosina (usado como bloqueador seletivo de linfopoiese, inibindo o mecanismo de proliferação dependente de IL-7) e flavonóides (com ação larvicida sobre *Aedes aegypti* e inibidores de acetilcolinesterase, sendo um possível tratamento para o mal de

Alzheimer) (SUPRATMAN et al., 2000; SUPRATMAN et al., 2001; TREVISAN et al., 2006; DE-PAIVA et al., 2008).



Figura 1. A: Exemplar florido de *Kalanchoe pinnata* Pers. B: Detalhe das flores.

A presença de glicosídeos cardiotônicos também é discutida, baseando-se em casos de intoxicações de animais domésticos após se alimentarem acidentalmente dessas espécies quando de seu uso ornamental (SMITH, 2004). Ainda sobre essa visão etológica, formigas foram mais atraídas pelo néctar de *K. gastonis-bonnierei* (tanto floral quanto extrafloral) do que por soluções de diversos tipos de açúcares, sugerindo a ocorrência de outros compostos químicos, responsáveis pela atração; são metabólitos secundários, utilizados pela planta com finalidades de estímulo à atração de insetos polinizadores (KOPTUR & TRUONG, 1998).

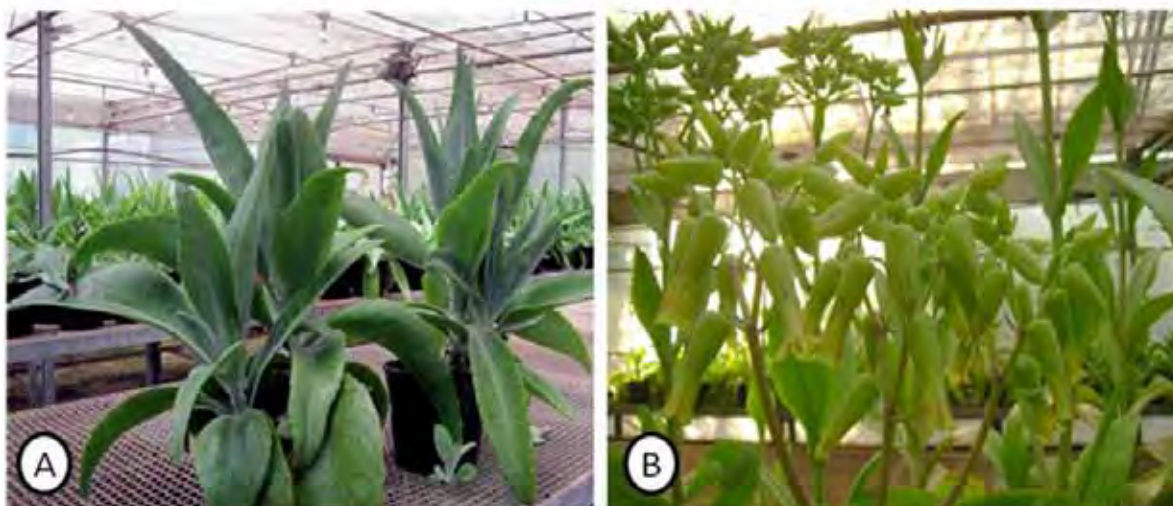


Figura 2. A: Exemplos de *Kalanchoe gastonis-bonnierei* Raym-Hamet & H. Perrier. B: Detalhe das flores.

O uso popular dessas espécies foi evidenciado por curandeiros latino-americanos que vivem e trabalham na cidade de Nova Iorque, cuidando de problemas relacionados à saúde da mulher (fibrose uterina, ondas de calor e menorrágia) recomendando a utilização de *K. gastonis-bonnierei*, principalmente no caso de fibroses uterinas (BALICK et al., 2000). Curandeiros da República Dominicana residentes na cidade de Nova Iorque utilizam esta planta no tratamento de fibrose uterina sendo uma das 4 plantas mais prescritas para essa finalidade (OSOSKI et al., 2002).

Ainda, *K. pinnata* é utilizada por moradores de Trinidad e Tobago no tratamento da hipertensão, concluindo-se que tal espécie tem evidências suficientes para justificar o seu uso tradicional para o tratamento de problemas urinários e hipercolesterolemia (LANS, 2006). Estudo de Cruz et al (2011) sugere seu uso como forma de modular o sistema imunológico, podendo ser utilizada no tratamento de doenças alérgicas relacionadas ao sistema respiratório.

K. pinnata também foi estudada quanto a outras atividades, mostrando seu potencial como cicatrizante (NAYAK et al., 2010), antileishmania (GOMES et al., 2010), contra furúnculos (KSHIRSAGAR & SINGH, 2001) e queimação no estômago (RAHMATULLAH et al., 2010). Ainda, há relato de caso de uso em humano com leishmaniose cutânea tratado com extrato de *K. pinnata*, obtendo-se redução no tamanho da lesão (TORRES-SANTOS et al., 2003).

A busca de plantas medicinais como fonte de princípios ativos antimicrobianos ocupa grande contingente em grupos de pesquisas, visto que existem poucos mecanismos de ação e poucos alvos no microorganismo, os quais acarretam resistência, principalmente em indivíduos que necessitam de procedimentos invasivos por longos períodos de tempo.

Kalanchoe pinnata foi estudada quanto à sua ação antibacteriana, tendo obtido destaque no combate a *Escherichia coli* (CIM=256 μ g mL⁻¹), *Pseudomonas aeruginosa* (CIM=64 μ g mL⁻¹), *Klebsiella pneumoniae* (CIM=512 μ g mL⁻¹), *Shigella flexneri* (CIM=256 μ g mL⁻¹), *Salmonella paratyphi* (CIM=256 μ g mL⁻¹), *Citrobacter* spp. (CIM=512 μ g mL⁻¹), *Staphylococcus aureus* (CIM=32 μ g mL⁻¹), *Enterococcus faecalis* (CIM=32 μ g mL⁻¹) e *Bacillus subtilis* (CIM=32 μ g mL⁻¹). Contudo, pouco se conhece a respeito de sua ação frente aos fungos, sendo estudada apenas sua atividade contra *Candida albicans* (CIM=128 μ g mL⁻¹) (AKINSULIRE, 2007). Novos estudos avaliando a atividade desta espécie vegetal são importantes com o intuito de avaliar a atividade frente a outras cepas fúngicas, aumentando seu espectro de ação antimicrobiana.

Flavonoides são metabólitos secundários que podem apresentar boa atividade antifúngica, assim como taninos, terpenoides e alcaloides (COWAN, 1999; ARIF et al., 2009). A literatura evidencia a ocorrência de flavonóides bioativos, tanto nas folhas quanto nas flores de plantas do gênero *Kalanchoe* (FERREIRA et al., 2000; NIELSEN et al., 2005; MUZITANO et al., 2006; KAMGANG et al., 2008; MUZITANO et al., 2009), de modo que podem ser estudadas como possíveis fontes de princípios ativos contra leveduras e bolores.

O gênero *Candida* é causador de diversas infecções, afetando principalmente pacientes imunossuprimidos. Todavia, pode afetar também indivíduos normais, sendo que *C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. guilliermondi* podem ser causadoras de artrite (CUENDE et al., 1993).

O uso por tempo prolongado dos antifúngicos tradicionais como anfotericina B e azóis levou ao surgimento de cepas fúngicas multirresistentes tanto de *C. albicans* quanto de outras espécies como *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *C. parapsilosis* (PRASAD & KAPOOR, 2005), havendo a necessidade de estudo de novas opções para promoção de uma terapêutica antifúngica eficaz, segura e racional.

3. Objetivos

3.1 Objetivos gerais

- Determinar diferenças anatômicas e histoquímicas nas folhas de *K. pinnata* Pers. e *K. gastonis-bonnierii* Raym.-Hamet & H. Perrier;
- Determinar os parâmetros físico-químicos de qualidade da droga vegetal originada das folhas de *K. pinnata* Pers. e *K. gastonis-bonnierii* Raym.-Hamet & H. Perrier;
- Testar a atividade antifúngica de extratos e frações de folhas de *Kalanchoe pinnata* Pers. e *Kalanchoe gastonis-bonnierii* Raym.-Hamet & H. Perrier.

3.2 Objetivos específicos

- Contribuir para a identificação das drogas originadas das folhas de *Kalanchoe pinnata* Pers. e *Kalanchoe gastonis-bonnierii* Raym.-Hamet & H. Perrier;
- Traçar o perfil histoquímico dessas espécies;
- Realizar testes de caracterização físico-química das drogas vegetais;
- Testar a atividade fungicida e fungistática de ambas as espécies contra *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata* e *Cryptococcus neoformans*.

Capítulo 1

Estudo anatômico e histoquímico das folhas de Kalanchoe gastonis-bonnieri Raym.-Hamet & H. Perrier e de Kalanchoe pinnata Pers.

1. Introdução

Apesar de eficaz e de ser natural, a utilização de plantas medicinais não deve ser vista como uma terapia sem efeitos adversos. Muitos casos de intoxicação são relatados, podendo ser causados por diversos fatores, dentre os quais citam-se a adulteração de fitoterápicos com espécies conhecidamente tóxicas ou com fármacos isolados, ou ainda, devido a identificações errôneas da espécie vegetal em uso (VEIGA-JÚNIOR et al., 2005), principalmente quando não se tem descrição detalhada da morfo-anatomia das espécies utilizadas. As espécies do gênero *Kalanchoe* não têm estudos quanto às características botânicas, sobretudo anatômicas, que possam contribuir para sua distinção e identificação.

Portanto, estudos que contribuam para a determinação de caracteres que facilitem a identificação de espécies vegetais de interesse ou, ainda, que auxiliem na distinção entre elas, passam a ser de extrema importância para auxiliar atitudes na Fitoterapia, com resultados reprodutíveis e, acima de tudo, seguros, com os benefícios superando os possíveis riscos.

Um dos aspectos a serem examinados é a morfo-anatomia das espécies, que apresentam diferenças quanto à organização dos tecidos, bem como a presença de algumas características, como tricomas e idioblastos. Os estudos histoquímicos e fitoquímicos contribuem tanto para o direcionamento de possíveis atividades farmacológicas, como também para traçar perfis que podem ser utilizados para identificação (HIGUCHI, 2007).

2. Objetivos

Buscou-se determinar as características anatômicas das espécies *K. gastonis-bonnierii* e *K. pinnata*, bem como seu perfil histoquímico, com a finalidade de encontrar características que permitissem sua distinção.

3. Materiais e Métodos

3.1 Obtenção do material vegetal

Folhas de *Kalanchoe gastonis-bonnierii* Raym.-Hamet & H. Perrier e de *Kalanchoe pinnata* Pers. foram coletadas do Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP, Campus de Araraquara, situado nas

coordenadas geográficas 21°48'52.44''S e 48°12'07.13''O. Esse material foi destinado às análises anatômicas e histoquímicas, realizadas no Laboratório de Botânica desta Faculdade.

Também foram coletados exemplares destinados à preparação de exsiccatas, as quais foram enviadas para tombamento no Herbário Rio Clarense sob número 55582 (*K. pinnata*) e 55584 (*K. gastonis-bonnierii*).

3.2 Estudo anatômico

Visando à análise anatômica, limbos de folhas totalmente expandidas de *K. gastonis-bonnierii* foram divididos em três segmentos, sendo utilizados apenas os terços medianos. Para tanto, subamostras de 9mm² da região da nervura central e do bordo foliar foram tomadas e fixadas em solução de glutaraldeído (2,5%) e formaldeído (4%), por imersão durante 12 horas, sob vácuo e temperatura ambiente (KARNOVSKY, 1965).

Posteriormente, o material foi submetido à desidratação em etanol 70%-100%, pré-infiltração e à infiltração para polimerização em resina sintética glicol metacrilato, segundo Kraus e Arduin (1997), seguindo as especificações do fabricante da resina (Leica[®]).

Após a inclusão, o material vegetal foi seccionado em micrótomo, visando obter secções de 7µm de espessura. Seguiu-se, então, à aderência das secções em lâminas de vidro e coloração com azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato pH 6,8 (KRAUS & ARDUIN, 1997). Os cortes em seguida foram submetidos à secagem em estufa a 37°C e na sequência montados em resina Permout[®]. O estudo anatômico das lâminas foi realizado em microscópio fotônico com captura de imagens (Zeiss[®]) e *software* AxioVision Rel 4.8.

Limbos de folhas totalmente expandidas de *K. pinnata* foram submetidas ao mesmo procedimento de fixação que as folhas de *K. gastonis-bonnierii*. Porém, quando submetidas à inclusão com resina glicol metacrilato, não foi possível realizar os cortes em micrótomo em virtude do aspecto farináceo apresentado pelo material vegetal. Por isso, procedeu-se a desidratação em soluções etanólicas 50%-100% e a inclusão deste material em parafina. Após a desidratação alcoólica o material foi submetido a imersão em mistura etanol:xilol (3:1, 2:1 e 1:1) e duas lavagens em xilol puro. O material foi colocado em uma mistura de parafina:xilol (1:2 e 1:1), seguido de inclusão em parafina

pura. Os cortes foram efetuados em micrótomo (7µm de espessura). Seguiu-se então a coloração dos cortes com azul de toluidina (KRAUS & ARDUIN, 1997).

Para tanto, realizou-se a desparafinização colocando-se as lâminas em cubas de vidro contendo xilol por uma hora e novamente colocando-se em xilol por mais 20 minutos. Na sequência, promoveu-se a hidratação do material utilizando-se uma série etanólica composta pela mistura entre etanol e água (etanol 100%, 80%, 70%, 50%, 30% e água pura), ficando o material 10 minutos em cada um. Após a coloração com azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato pH 6,8 por um a três minutos, realizou-se a desidratação com a série etanólica crescente, finalizando-se com o material sendo colocado em xilol puro, sendo que cada etapa de aplicação das soluções durou um minuto. As lamínulas foram afixadas sobre as secções anatômicas utilizando-se Entellan[®] (KRAUS & ARDUIN, 1997).

3.3 Estudo histoquímico

Para a realização dos testes histoquímicos, folhas das espécies em estudo foram submetidas a cortes transversais à mão e recolhidos em água, segundo os procedimentos propostos por Ascensão (2003), foram testados quanto à ocorrência de compostos polares e apolares. Em seguida, os cortes foram analisados e as imagens registradas em microscópio com captura de imagens (Zeiss[®]).

Quanto ao estudo das substâncias apolares, foram utilizados os seguintes reagentes: Sudan III (JOHANSEN, 1940) para lipídios totais; sulfato azul do Nilo (CAIN, 1947) para diferenciação de lipídios ácidos e neutros; reagente de NADI (DAVID & CARDE, 1964) para identificação de óleos essenciais e oleoresinas; tricloreto de antimônio (HARDMAN & SOFOWORA, 1972; MACE & HOWELL, 1974) para identificação de esteroides; ácido sulfúrico para a identificação de lactonas sesquiterpênicas (GEISSMAN & GRIFFIN, 1971) e 2,4-dinitrofenilhidrazina (GANTER & JOLLÉS, 1969-1970) para identificação de terpenoides com grupo carbonila.

Em relação aos compostos polares, foram utilizados os seguintes reagentes: cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) para a identificação de compostos fenólicos totais; vanilina clorídrica (MACE & HOWELL, 1974) para a identificação de taninos; reagente de Dragendorff (SVENDSEN & VERPOORTE, 1983), Bertrand, Mayer e Bouchardat

para identificação de alcaloides; lugol (JENSEN, 1962) para a identificação de amido; e azul brilhante de Comassie (FISCHER, 1968) para identificar proteínas totais.

Ressalta-se, ainda, que para a identificação de lactonas sesquiterpênicas foi utilizado o método de Geissman e Griffin (1971), modificado por HIGUCHI (2007) utilizando-se uma solução de ácido sulfúrico:glicerina (1:1), em substituição ao ácido sulfúrico concentrado, de modo a permitir melhor visualização dos resultados em virtude da preservação das estruturas celulares por mais tempo.

Em estudos histoquímicos empregados na detecção de metabólitos celulares verificam-se em alguns casos, reações positivas para mais de uma substância (conforme o reagente utilizado), daí a necessidade de testes complementares e utilização de controles para a garantia da correta interpretação. Em virtude desta recomendação, foram realizadas três repetições para cada teste.

Ainda, os controles negativos utilizados foram realizados passando cortes a mão por solução de hipoclorito de sódio 2%, seguindo-se série etanólico-cetônica crescente, reidratando-se os cortes em seguida em uma série etanólico-cetônica decrescente, seguindo-se os testes histoquímicos com os reagentes anteriormente citados.

4. Resultados e discussão

4.1 Estudo anatômico

O conhecimento anatômico é de suma importância para a correta identificação de uma espécie vegetal, visto que diversos elementos anatômicos podem ser utilizados para diferenciação de matérias-primas vegetais submetidas ao controle de qualidade.

Na Figura 3, pode-se observar que *Kalanchoe gastonis-bonnieri* apresenta folhas com as seguintes características: no mesofilo, a epiderme é uniestratificada (B), com células tabulares e há presença de tricomas glandulares em forma de clava (D), com pedúnculo e cabeça bisseriados. O parênquima clorofiliano é homogêneo (A) contendo isodiamétricas sendo dificilmente distinguido entre parênquima paliçádico e parênquima lacunoso.

Há ocorrência de compostos fenólicos em estrato celular sub-epidérmico (C), evidenciados pela coloração típica obtida com o azul de toluidina. Próximo ao bordo observa-se uma região, composta por tecido meristemático (I) guarnecido por feixes vasculares, circundada por endoderme uniestratificada de células isodiamétricas (J e L).

Esta região está relacionada com a reprodução assexuada desta espécie, cuja característica é a formação de plântulas em reentrâncias na margem das folhas. A nervura central possui células da epiderme menores que no mesofilo e as células do parênquima bastante parecidas com aquelas do mesofilo. Próximo à face abaxial observa-se colênquima angular com quatro a cinco camadas de células (H). O feixe vascular da nervura principal é do tipo colateral com xilema voltado para a face adaxial da folha e floema para a abaxial.

O parênquima radial do xilema é evidente possuindo idioblastos fenólicos formando fileiras definidas (F). Há ocorrência de feixes vasculares de menor calibre na região da nervura, bem como no mesofilo, acompanhados com frequência de idioblastos fenólicos (G). Apresenta, ainda, estômatos anisocíticos (E) na face abaxial da epiderme.

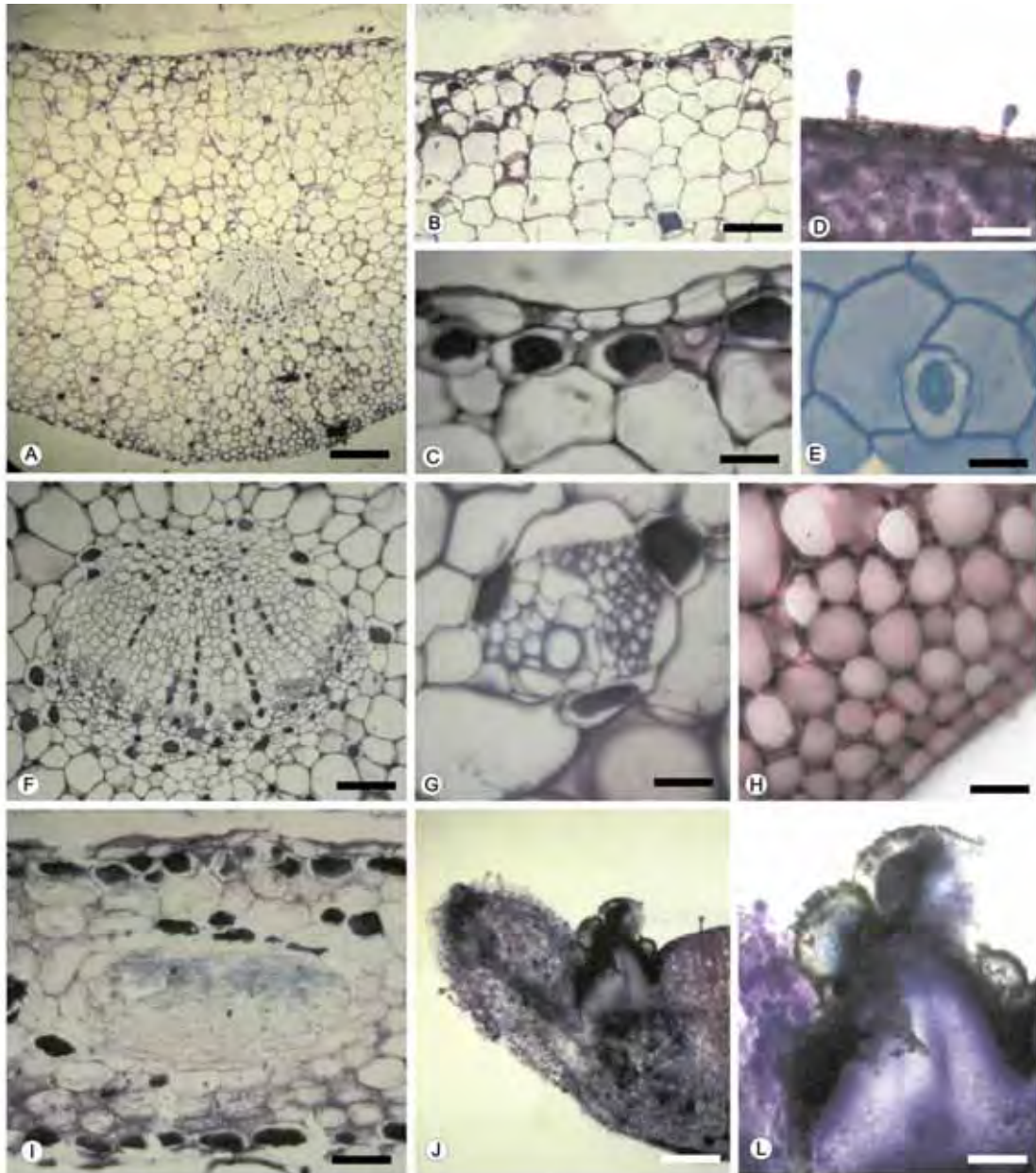


Figura 3: Fotomicrografias de aspectos anatômicos de folhas de *Kalanchoe gastonis-bonnieri*. A: visão da nervura central; B: epiderme uniestratificada; C: detalhe da camada unisseriada de idioblastos tânicos; D: tricomas claviformes na epiderme; E: aparelho estomático anisocítico na face abaxial da epiderme; F: detalhe do feixe vascular colateral da nervura central mostrando no parênquima radial do xilema a ocorrência de idioblastos tânicos; G: detalhe da nervura central mostrando pequenos feixes vasculares; H: detalhe da nervura central mostrando o colênquima; I: detalhe do bordo foliar evidenciando a região vascularizada com células jovens em divisão para originar as plântulas; J: visão transversal da extremidade da folha mostrando reprodução assexuada; L: detalhe da muda. Barras: A e J: 200 μ m; B: 100 μ m; C, H e L: 32 μ m; D e F: 50 μ m; E e G: 16 μ m.

Quanto a *K. pinnata* observou-se que sua epiderme é uniestratificada com células tabulares (C) e tricomas glandulares em formato de clava com pedúnculo e

cabeça bisseriados (E). O parênquima clorofiliano é homogêneo e apresenta células com formato isodiamétrico (A). Acompanhando a epiderme, pode-se observar a presença de idioblastos contendo compostos fenólicos, porém em menor quantidade quando comparado com *K. gastonis-bonnieri* (D), o que foi comprovado posteriormente nos testes histoquímicos.

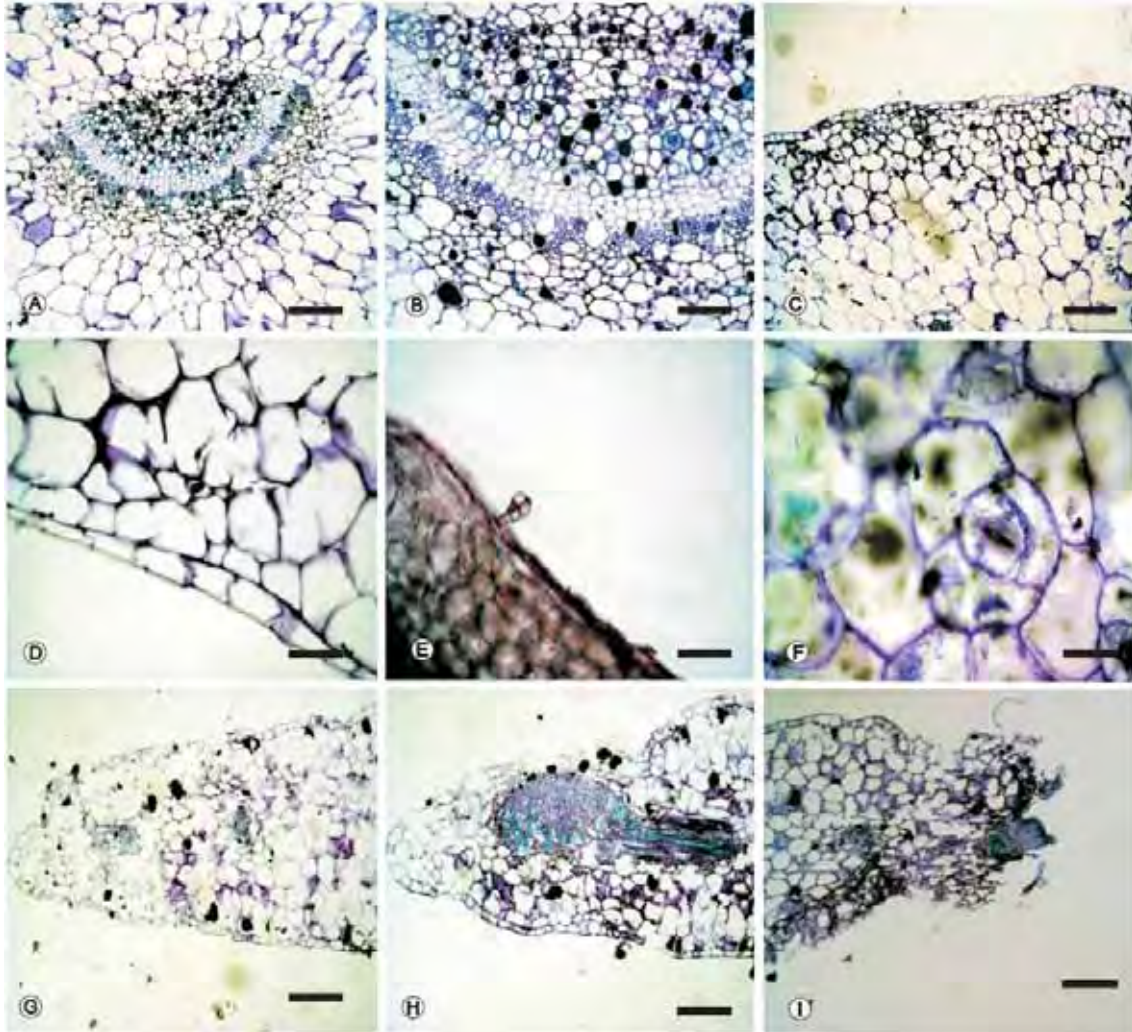


Figura 4: Fotomicrografias de aspectos anatômicos de folhas de *Kalanchoe pinnata*. A: visão da nervura central; B: detalhe da nervura central mostrando feixe vascular colateral; C: colênquima; D: epiderme unisseriada com células tabulares; E: tricoma glandular; F: estômato anisocítico; G: detalhe do bordo foliar; H: detalhe do bordo foliar evidenciando a região vascularizada com células jovens em divisão para originar plântulas; I: visão transversal da extremidade da folha mostrando plântula em desenvolvimento. Barras: A, C, G, H e I: 125µm; B e F: 60µm; D e E: 30µm.

Próximo ao bordo observa-se regiões bem vascularizadas com tecido meristemático circundado por bainha uniestratificada, as quais estão relacionadas à ocorrência de reprodução vegetativa característica deste gênero (H e I). A nervura

central apresenta células epidérmicas menores do que as do mesofilo, observando-se a ocorrência de colênquima, com três a cinco séries de células, na face abaxial. O feixe vascular central é do tipo colateral (B), com o xilema voltado à face adaxial e o floema voltado à face abaxial. Neste caso, a observação do parênquima radial do xilema é discreta e não são notados os idioblastos fenólicos, os quais estão presentes no parênquima próximo às regiões adaxiais dos elementos de vaso e ocorrem de modo difuso (B). Em visão paradérmica da face adaxial da epiderme, verificam-se também estômatos anisocíticos (F) (Figura 4).

O estudo anatômico demonstrou grande semelhança entre as espécies em estudo, porém algumas diferenças foram observadas, como a organização da nervura central e a distribuição dos compostos fenólicos dos feixes vasculares.

4.2 Estudo histoquímico

O estudo histoquímico das folhas de *K. gastonis-bonnieri* indicou a presença dos seguintes grupos de metabólitos secundários: esteroides, terpenoides com grupo carbonila, compostos fenólicos, taninos e alcaloides (Figura 5).

Quanto às folhas de *K. pinnata*, observou-se a presença de terpenoides com grupo carbonila, compostos fenólicos, taninos, alcaloides e antocianinas, as quais podem ser observadas como pigmento natural da folha (Figura 6). Os resultados comparativos dos testes histoquímicos estão representados na Tabela 1.

Tabela 1: Determinação do perfil histoquímico das espécies *Kalanchoe gastonis-bonnieri* Raym-Hamet & H. Perrier e *Kalanchoe pinnata* Pers.

Metabólito secundário	<i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i>	<i>Kalanchoe pinnata</i>
Lipídeos totais	-	-
Lipídeos ácidos e neutros	-	-
Óleos essenciais e oleorresinas	-	-
Esteroides	+	-
Lactonas sesquiterpênicas	-	-
Terpenoides com grupo carbonila	+	+
Compostos fenólicos	+	+
Taninos	+	+
Alcaloides	+	+
Amido	-	-
Proteínas totais	-	-
Antocianinas	-	+

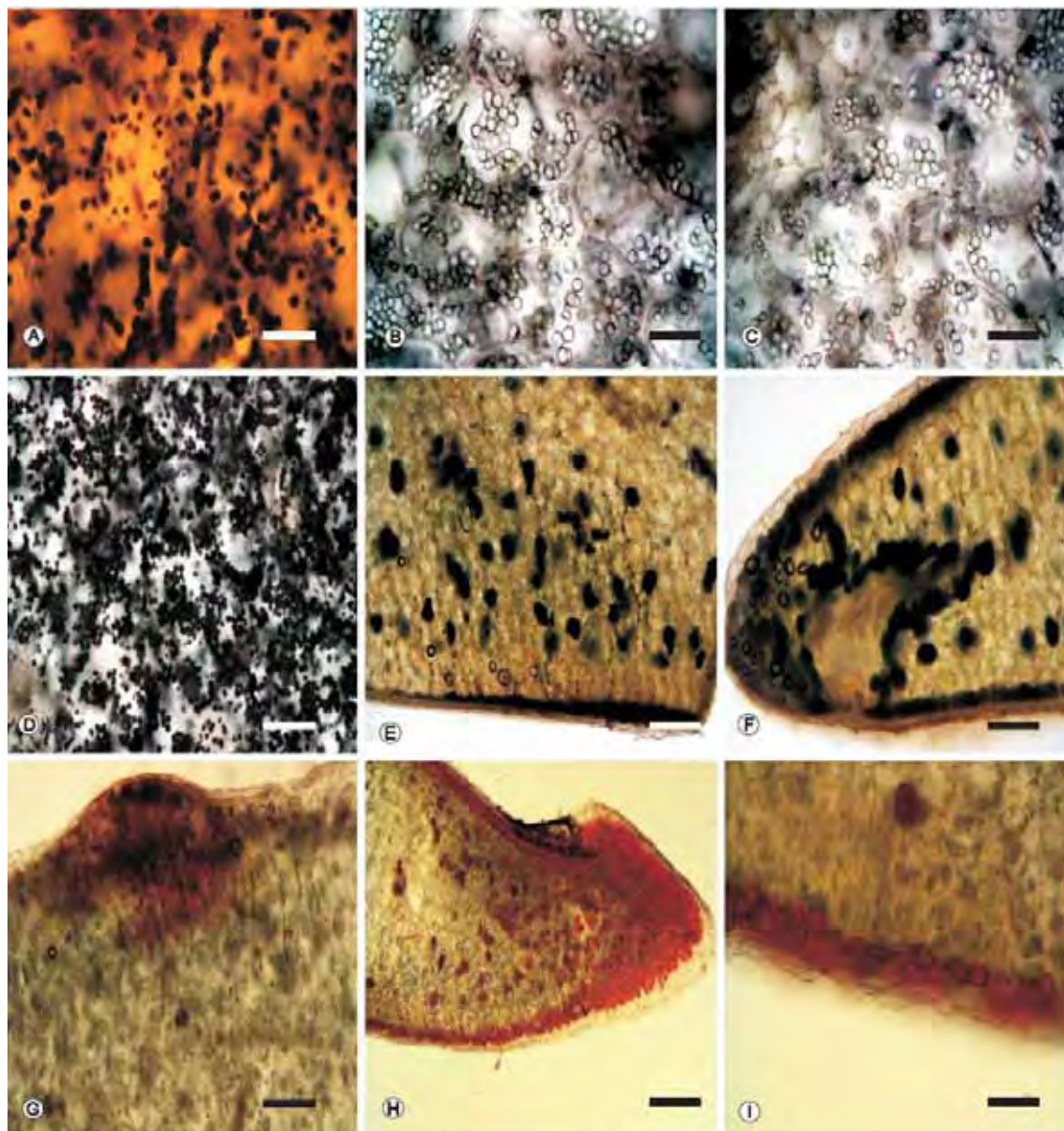


Figura 5: Fotomicrografias mostrando os resultados dos testes histoquímicos realizados em folhas de *Kalanchoe gastonis-bonniieri*. A: alcaloides (Dragendorff); B: alcaloides (Bertrand); C: alcaloides (Mayer); D: alcaloides (Bouchardat); E e F: compostos fenólicos (cloreto férrico); G: esteróides (triclureto de antimônio); H e I: taninos (vanilina clorídrica). Escalas: A, B, C e I: 60 μ m; D, F e G; 125 μ m; E e H: 250 μ m.

A ocorrência de diferentes classes de compostos nas plantas pode ser utilizada como um parâmetro de diferenciação entre as espécies. *Kalanchoe gastonis-bonniieri* apresentou resultado positivo para esteróides, enquanto que *Kalanchoe pinnata* demonstrou possuir antocianinas. Por esta razão, tais aspectos podem ser utilizados buscando-se a identificação das espécies. Contudo, novos estudos devem ser realizados

para se confirmar a ocorrência desses compostos em plantas coletadas em épocas diferentes, bem como em regiões diferentes já que podem ocorrer variações de aclimatação e de sazonalidade, as quais podem alterar o metabolismo vegetal (SOUZA et al., 2005).

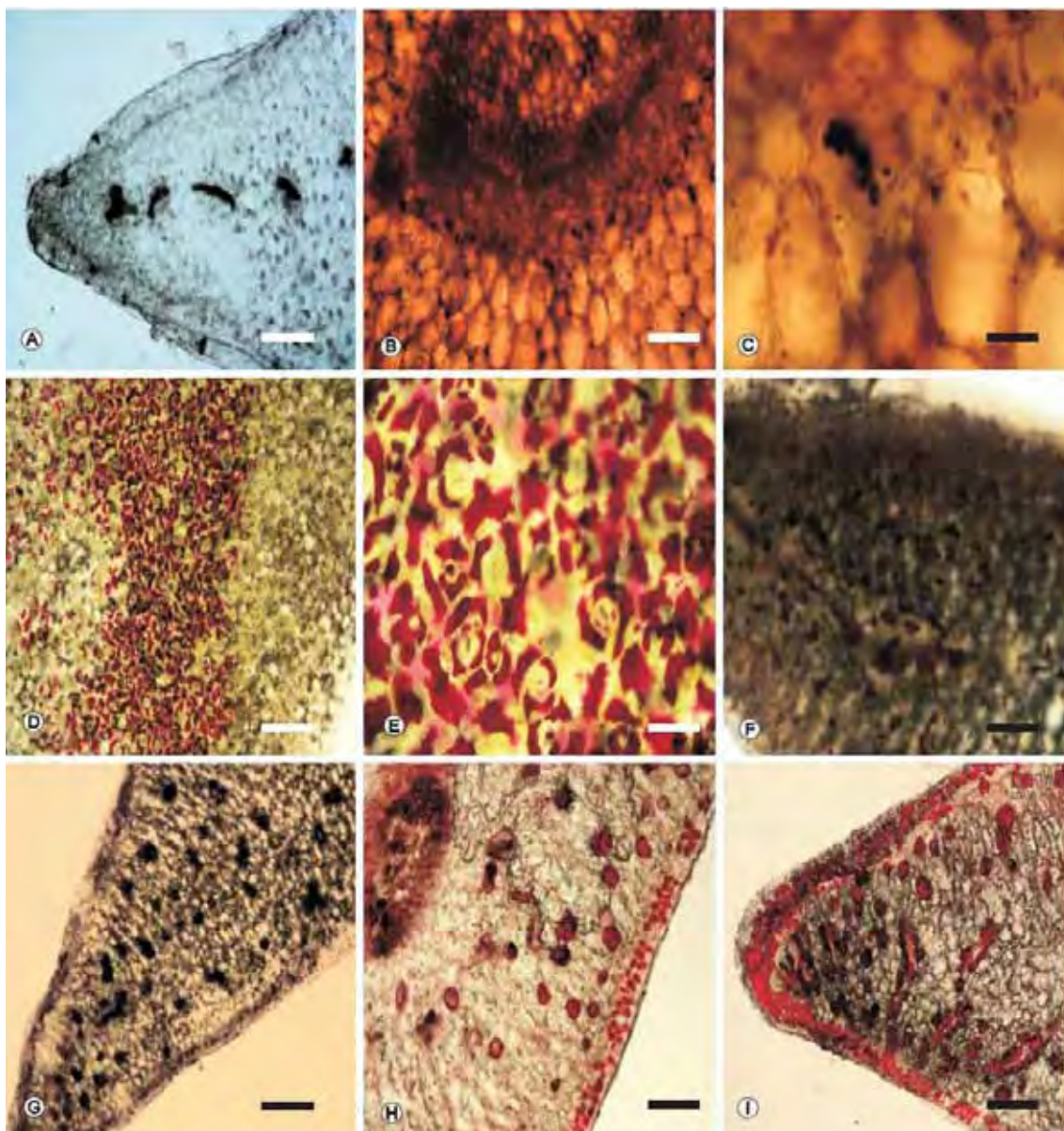


Figura 6: Fotomicrografias mostrando os resultados dos testes histoquímicos realizados em folhas de *Kalanchoe pinnata*. A: controle; B e C: alcaloides (Dragendorff); D e E: antocianinas; F: terpenoides com grupo carbonila (2,4-DNF); G: compostos fenólicos (cloreto férrico); H e I: taninos (vanilina clorídrica). Escalas: A, B, F, G, H e I: 125 μ m; C: 30 μ m; D: 250 μ m; E: 60 μ m.

5. Conclusão

Os estudos anatômico e histoquímico de plantas medicinais podem ser explorados para auxiliar a identificação. Porém, trata-se de tarefa árdua já que muitas plantas apresentam grande semelhanças, principalmente quando pertencem ao mesmo gênero.

No estudo anatômico, algumas diferenças foram encontradas entre *K. gastonis-bonnieri* e *K. pinnata*, porém a histoquímica permitiu a diferenciação entre as espécies em função da ocorrência de compostos químicos distintos (esteroides e antocianinas, respectivamente).

A anatomia apresentou grande semelhança a exceção da organização de nervura central e da distribuição dos compostos fenólicos pelo parênquima radial do xilema. Tais parâmetros são importantes para auxiliar na identificação das espécies, porém devem ser associados a outros, sejam eles morfológicos ou químicos.

Capítulo 2

Estudo farmacognóstico das folhas de Kalanchoe gastonis-bonnieri e de Kalanchoe pinnata e avaliação da atividade antifúngica de diferentes extratos destas espécies vegetais

1. Introdução

O uso de drogas vegetais é bastante difundido por toda população, sendo que segundo a OMS, 80% dos indivíduos fazem uso de plantas medicinais. Isso ocorre em virtude do alto custo das especialidades farmacêuticas, da facilidade de aquisição e da crença de que, por ser uma terapêutica baseada em produtos naturais, não ocorrerão efeitos adversos.

Todavia, deve-se garantir que a droga vegetal a ser utilizada corresponde a um material de qualidade e que seu uso será seguro e eficaz. Para tanto, deve-se realizar a caracterização da matéria-prima vegetal por meio de técnicas de caracterização físico-química.

Tais parâmetros são importantes para avaliar se a droga vegetal obtida tem qualidade e se deve seguir o processo produtivo. Logo, diversos estudos devem avaliar todas essas características de modo a contribuir para um consenso quanto aos parâmetros e perfis de qualidade para uma determinada espécie vegetal.

Além disso, a presença dos metabólitos secundários responsáveis pela atividade deve ser averiguada. Quando não se tem conhecimento de quais são esses metabólitos, deve-se realizar uma triagem fitoquímica preliminar, podendo-se determinar quais classes de metabólitos estão presentes, como alcaloides, flavonóides, taninos, antraquinonas, saponinas, dentre outros.

Kalanchoe pinnata já demonstrou possuir potencial como agente antibacteriano (AKINSULIRE, 2007), bem como outras espécies de *Kalanchoe* revelaram possuir metabólitos secundários com possível atividade antimicrobiana, como flavonoides (MUZITANO et al., 2009). Contudo, não foi estudada ainda a atividade de *K. pinnata* e *K. gastonis-bonnierei* frente a espécies de fungos.

Estudo realizado em hospital na Tailândia demonstrou que entre 2004 e 2009, 206 pacientes foram internados com candidemia, sendo que a taxa de mortalidade foi de 54%, o que indica que ainda há dificuldade para o tratamento desta doença (JUTIAMORNLERD et al., 2011). Já em um hospital terciário na Inglaterra, em estudo realizado entre 2005 e 2008, Das et al. (2011) encontraram 107 casos de candidemia, sendo que a taxa de mortalidade foi de 37%, demonstrando que não se trata de um problema relacionado apenas a países subdesenvolvidos.

Diversas metodologias podem ser utilizadas para determinação da atividade antifúngica. A técnica de difusão em meio sólido consiste em permitir que a substância

a ser testada difunda através de um meio de cultura sólido, no qual foi inoculado o micro-organismo de interesse, observando-se a formação de um halo de inibição do crescimento. Tal metodologia é interessante pelo baixo custo e por necessitar de uma pequena quantidade de material, porém apresenta problemas já que as substâncias podem não difundir adequadamente pelo meio sólido, não demonstrando atividade (SCORZONI et al., 2007).

O teste de diluição em tubos utiliza meio de cultura líquido, no qual é inoculado o micro-organismo e adiciona-se a substância teste. É uma metodologia interessante porque coloca o micro-organismo em contato direto com a droga, porém necessita de grande quantidade de material, tornando o custo elevado. Além disso, necessita de grande quantidade de substâncias extraídas de material vegetal, cujo rendimento geralmente é baixo, inviabilizando os estudos (SCORZONI et al., 2007).

Já a metodologia de diluição em micro-placa utiliza meio de cultura líquido, permitindo o contato direto, além de utilizar uma quantidade bastante reduzida de material vegetal, viabilizando estudos em que o rendimento da extração é baixo, além de reduzir os custos de realização (SCORZONI et al., 2007). Mundialmente, é padronizada pelo documento M27-A2 do Clinical Laboratory and Standards Institute (CLSI), o qual define os parâmetros utilizados para a avaliação da atividade fungistática de substâncias vegetais ou sintéticas frente a leveduras.

Portanto, novos estudos são necessários para o desenvolvimento de novas formulações capazes de combater as infecções fúngicas, para as quais as plantas são clássicas fornecedoras de princípios ativos, devendo-se estabelecer seus parâmetros de controle de qualidade e garantir sua atividade utilizando-se testes de atividade biológica.

2. Objetivos

Buscou-se avaliar a atividade antifúngica dos extratos etanólicos e respectivas frações das espécies *Kalanchoe gastonis-bonnieri* e *Kalanchoe pinnata*, além de determinar os parâmetros físico-químicos destas drogas vegetais, bem como os seus perfis fitoquímicos, visando a contribuir para o estabelecimento de parâmetros de controle de qualidade para estas espécies vegetais.

3. Materiais e métodos

3.1 Obtenção do material vegetal

Folhas de *K. gastonis-bonnieri* e de *K. pinnata* foram coletadas (Horto de Plantas Medicinais e Tóxicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas – Araraquara) e lavadas em solução de hipoclorito de sódio (0,2%) e água destilada na sequência. O excesso de água foi removido e as folhas conduzidas à secagem em estufa de circulação de ar a 40°C até massa constante. Seguiu-se trituração das folhas secas em moinho de facas, de modo a reduzir o tamanho das partículas e promover, posteriormente, maior área de contato entre as partículas e o líquido extrator.

3.2 Determinação das características físico-químicas do pó das folhas

Os testes para caracterização da droga vegetal quanto aos seus parâmetros físico-químicos foram realizados segundo metodologias farmacopeicas, utilizando-se como referências a Farmacopeia Brasileira 4ª ed. e seus suplementos e a Farmacopeia Brasileira 5ª ed. (2010); The United States Pharmacopeia 26th ed. (2003), e outras não farmacopeicas, descritas por HARBORNE, 1998; ANSEL et al., 2000; COSTA, 2001 e AULTON, 2005. Todos os testes foram realizados em triplicata, sendo os valores expressos na forma média ± desvio padrão.

3.2.1 Análise granulométrica

Visando à padronização da droga vegetal, foi determinado o tamanho médio da partícula de cada droga vegetal, utilizando-se a passagem de 25,0g do pó por uma sequência de tamises com abertura de malhas diferentes, correspondentes a 0,840; 0,420; 0,250; 0,177; 0,125mm com tampa e recipiente coletor, utilizando tamisador vibratório na escala de 100 vibrações/minuto, durante 30 minutos. A quantidade de pó remanescente em cada tamis e no coletor foi determinada e o tamanho médio de partícula foi calculado de acordo com a equação sugerida por Ansel et al. (2000).

$$TMP = \sum \frac{(\text{retida}) \times (\text{abertura})}{100} \text{ média}$$

3.2.2 Determinação da densidade aparente das folhas secas pulverizadas

Cinquenta gramas do pó de cada droga vegetal foram amostrados (AMOSTRAGEM, 1988) e colocados em encapsulador contendo 25 cápsulas tamanho

0, as quais tiveram suas massas medidas (vazias e cheias), sendo que a subtração entre esses valores é correspondente à massa de droga vegetal encapsulada. Sendo assim, a densidade aparente de cada droga foi determinada pela relação massa de droga/volume das cápsulas, o qual corresponde a 17mL (MARTINS & SACRAMENTO, 2004).

3.2.3 Determinação do resíduo sólido do vegetal fresco

Três amostras de 10,00g de folhas frescas de cada espécie vegetal foram colocadas em estufa com circulação de ar a 40°C. A massa foi medida diariamente até obtenção de valores constantes. Os resultados foram expressos em porcentagem, sendo referentes à quantidade de água perdida durante o processo de secagem (DETERMINAÇÃO, 1997).

3.2.4 Determinação da perda por dessecação

Colocou-se 10,00g da droga pulverizada em uma cápsula, com a massa previamente determinada, em estufa a 105°C por 5 horas e foi pesada após arrefecimento. Seguiu-se a dessecação, avaliando-se a massa a cada 1 hora, até massa constante. A seguir, a perda por dessecação pôde ser determinada pela equação proposta pela Farmacopeia Brasileira 5ª edição:

$$\frac{Pu - Ps}{Pa} \times 100$$

Onde:

Pa: massa da amostra;

Pu: massa da cápsula contendo a amostra antes da dessecação;

Ps: massa da cápsula contendo a amostra após a dessecação.

3.2.5 Determinação do valor pH

Sobre 1,00g de droga vegetal foi vertido 99,00g de água em ebulição, deixando-se repousar por 15 minutos. A seguir, o líquido extrativo foi filtrado e após esfriar, o pH medido com peagômetro previamente calibrado. Para maior reprodutibilidade, foi também determinado o pH da água utilizada para obtenção da solução extrativa.

3.2.6 Determinação do teor de cinzas totais

Primeiramente, cadinhos de porcelana foram calcinados em mufla a 450°C e deixados para resfriar em um dessecador por 30 minutos. A seguir, sua massa foi determinada. Três gramas de pó das drogas vegetais foram pesados e colocados nos

cadinhos, sendo levados para mufla a 450°C por 2 horas. Retirou-se, então, os cadinhos da mufla e deixou-se resfriar em dessecador por 30 minutos, seguindo-se determinação da massa até valor constante. Os resultados foram expressos em porcentagem, indicando o resíduo de cinzas remanescentes no cadinho.

3.2.7 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido

As cinzas obtidas previamente no ensaio de cinzas totais foram aquecidas durante 5 minutos com 25mL de ácido clorídrico 10% (v/v) e posteriormente foi completado o volume para 100mL com água destilada. Filtrou-se a solução obtida em papel filtro isento de cinzas e o resíduo foi lavado com água quente até o filtrado sair límpido e a medida do pH (obtida através de papel indicador universal), ser igual a 7. O papel de filtro foi colocado no cadinho e levado à mufla para incineração a 800°C até massa constante. Os resultados representam a porcentagem de cinzas insolúveis em relação à massa inicial de droga vegetal.

3.2.8 Determinação do teor de extrativos

Quatro gramas de droga foram colocados em balão de fundo chato, ao qual adicionou-se, ainda, 100mL de água. A seguir, mediu-se a massa do sistema balão – droga – água. Posteriormente, o balão foi deixado em repouso por 1 hora. Então, o balão foi acoplado a um sistema de refluxo, no qual foi aquecido por mais 1 hora. Completou-se a massa do sistema com o líquido solvente, filtrando-se em seguida. Vinte e cinco mililitros do filtrado foram evaporados em banho-maria e colocados em estufa a 105°C para total secagem. Pesou-se o resíduo obtido e o teor de extrativos foi determinado em porcentagem (WHO, 2001).

3.3 Triagem fitoquímica preliminar

A triagem fitoquímica é utilizada para se determinar quais metabólitos secundários estão presentes na droga vegetal. É bastante importante quando não se conhece o metabólito ativo da espécie em estudo.

Os testes foram realizados seguindo-se a metodologia proposta por Costa (2001).

3.3.1 Saponinas

A 2,00g da droga vegetal, adicionou-se 10,00mL de água deionizada, fervendo-se por 5 minutos. Filtrou-se a solução resultante para um tubo de ensaio, o qual foi

agitado vigorosamente por 15 segundos. A ocorrência de espuma e sua permanência durante 15 minutos foi considerada como resultado positivo.

3.3.2 Taninos

A solução extrativa foi obtida após realização de um decocto com 5,00g de droga vegetal e 100,00mL de água deionizada durante 15 minutos. A seguir, a solução foi filtrada e, após esfriar, foi utilizada para a realização de testes com solução de gelatina (na qual a formação de precipitado indica reação positiva) e com cloreto férrico a 1% (a formação de cor azul indica a presença de taninos hidrolisáveis e de cor verde a presença de taninos condensados).

3.3.3 Flavonoides

Colocou-se 20,00mL de éter de petróleo em 3,00g de droga vegetal e agitou-se durante 10 minutos, em banho-maria, filtrando-se a solução resultante em papel de filtro. O pó desengordurado foi então submetido à extração dos flavonóides utilizando-se 30,00mL de metanol, aquecendo-se novamente. Filtrou-se a solução, a qual foi evaporada até a secura e ao resíduo decorrente desta secagem adicionou-se 10,00mL de etanol.

A seguir, foram realizadas as reações de Shinoda (na qual o desprendimento de gás hidrogênio e a mudança na coloração para vermelho indicam resultado positivo), reação de Taubock (cujo resultado positivo é a fluorescência amarelo-esverdeada quando exposta à luz ultra-violeta – UV), reação de Pew (a coloração vermelha indica resultado positivo), reação com cloreto férrico (a qual pode desencadear o surgimento de coloração verde, amarela ou violácea, dependendo do flavonóide presente) e a reação com cloreto de alumínio (a qual também permite a visualização de fluorescência sob luz UV).

3.3.4 Antraquinonas

Para a pesquisa de compostos antraquinônicos livres, 1,00g da droga vegetal foi agitado com 10,00mL de éter etílico em um béquer, filtrando-se a solução obtida para tubo de ensaio, ao qual adicionou-se 1,00mL de amônia diluída. A mudança de coloração da camada aquosa para róseo indica reação positiva.

Já para os glicosídeos antraquinônicos, o pó residual da extração anterior foi fervido com 20,00mL de água deionizada, filtrando-se a solução em seguida. A seguir,

realizou-se a reação de Borntrager, na qual a formação de coloração rósea na camada aquosa indica reação positiva.

3.3.5 Glicosídeos cardiotônicos

Aqueceu-se 5,00g da droga vegetal em banho-maria juntamente com 50,00mL de etanol 70%. A solução resultante foi filtrada, realizando-se em seguida uma reação de precipitação para a retirada de possíveis interferentes utilizando-se 30,00mL de água deionizada e 15,00mL de solução de acetato de chumbo 10%, e filtrada novamente. Adicionou-se, então 10,00mL de solução de fosfato ácido de sódio 10%, filtrando-se novamente após agitação. O filtrado foi transferido para funil de separação e extraído com 15,00mL de clorofórmio por duas vezes, juntando-se as fases orgânicas a qual foi evaporada até metade do volume.

Com esta solução concentrada, realizou-se as reações de Legal (na qual coloração vermelha indica resultado positivo), reação de Kedde (o resultado positivo é expresso por coloração vermelha a castanho fugaz), reação de Pesez (novamente a coloração vermelha indica resultado positivo), reação de Keller-Killiani (a formação de um anel castanho avermelhado é considerada resultado positivo) e a reação de Liebermann-Burchard (cujo resultado positivo é observado quando do surgimento de coloração castanha).

3.3.6 Alcaloides

Após ser alcalinizada com carbonato de sódio 10%, 5,00g da droga vegetal foram extraídas com 25,00mL de clorofórmio com auxílio de pistilo. A seguir, a solução extrativa foi filtrada em papel de filtro previamente umedecido com clorofórmio e colocada em funil de decantação. Adicionou-se 7,00mL de ácido clorídrico 2% e agitou-se, deixando em repouso até separação das fases, de modo que os alcaloides foram separados na fase aquosa, na forma de sal. Essa solução aquosa foi utilizada nas reações com reagentes de Dragendorff, Mayer, Bertrand e Bouchardat, nas quais a precipitação ou turvação da solução indicam resultado positivo.

3.3.7 Cumarinas

Em um béquer de 10mL foi colocada uma pequena quantidade de droga vegetal, cobrindo-se o béquer com uma lâmina de vidro. Aqueceu-se o béquer por 10 minutos e o sublimado formado na lâmina foi recolhido com 0,5mL de metanol. Três gotas foram

colocadas em papel de filtro, adicionando-se em seguida uma gota de solução etanólica de KOH. Expôs-se à luz UV e observou-se se ocorria formação de fluorescência verde.

3.3.8 Metilxantinas

Aqueceu-se até fervura 1,00g de droga vegetal, 5,00mL de ácido sulfúrico e 5,00mL de água deionizada. Após filtração, neutralizou-se o ácido com amônia diluída e extraiu-se em funil de decantação com 5,00mL de clorofórmio. Evaporou-se a fase orgânica e ao resíduo foram adicionadas 3 gotas de ácido clorídrico 6N e 2 gotas de peróxido de hidrogênio, devendo aparecer coloração vermelha após a evaporação. Ao resíduo, adicionou-se amônia diluída, sendo que coloração violeta indicava resultado positivo.

3.4 Cromatografia em camada delgada

A separação preliminar das substâncias contidas nos extratos e frações foi realizada utilizando-se a técnica de cromatografia em camada delgada (CCD) segundo Wagner et al. (1996).

3.4.1 Obtenção dos extratos e frações

Os extratos foram obtidos por maceração das drogas vegetais de *K. gastonis-bonnierii* e de *K. pinnata* com etanol 70% (1:10), durante 7 dias, sendo que a solução extrativa foi concentrada em evaporador rotativo, seguido de secagem em estufa a 40°C.

Parte do pó obtido foi ressuspensão em água destilada e colocado em funil de decantação. Seguiu-se partição com solventes de polaridade crescente (*n*-hexano, acetato de etila e *n*-butanol), em proporções iguais de solução aquosa e solvente orgânico, obtendo-se, assim, as frações a serem testadas. Porém, em virtude do extrato de *Kalanchoe pinnata* ter gerado um resíduo insolúvel após o término das extrações sucessivas com solventes orgânicos, esse resíduo foi recolhido utilizando-se etanol 70% para dissolvê-lo, sendo esta fração denominada fração etanólica.

3.4.2 Técnicas cromatográficas

As técnicas cromatográficas utilizadas seguiram as orientações de Wagner et al. (1996) quanto aos reagentes a serem utilizados para a detecção dos princípios ativos e foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, sob supervisão do Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos. Necessitou-se, porém, utilizar outros sistemas de fase móvel em virtude das

especificidades das frações testadas (Tabela 2). Como fase estacionária foi utilizada sílica gel 60 G.

Tabela 2: Fase móvel e reagentes utilizados para determinação de metabólitos secundários utilizando-se técnica de cromatografia em camada delgada.

Metabólito secundário	Fase móvel	Reagente utilizado
Terpenos	<i>n</i> -hexano:ac. etila:isopropanol (70:28:2)	Anisaldeído sulfúrico
Flavonoides	<i>n</i> -butanol:ác. acético:água (65:15:25)	NP-PEG+UV
Antraquinonas	<i>n</i> -butanol:ác. acético:água (65:15:25)	KOH 5% (etanol)
Glicosídeos cardiotônicos	<i>n</i> -butanol:ác. acético:água (65:15:25)	SbCl ₃ 20% (clorofórmio)+UV
Alcaloides	<i>n</i> -butanol:ác. acético:água (65:15:25)	Dragendorff
Saponinas	<i>n</i> -butanol:ác. acético:água (65:15:25)	Vanilina sulfúrica
Cumarinas	<i>n</i> -hexano:ac. etila:isopropanol (70:28:2)	UV KOH 10% (etanol)

Os resultados obtidos foram comparados com os obtidos nos testes histoquímico e triagem fitoquímica preliminar, de modo a tentar se estabelecer o perfil químico das espécies em estudo.

3.5 Determinação da atividade antifúngica

Os procedimentos referentes ao estudo da atividade antifúngica foram realizados no Laboratório de Micologia Clínica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara, sob a supervisão das professoras Ana Marisa Fusco Almeida e Maria José Soares Mendes Gianinni.

3.5.1 Seleção e Cultivo das linhagens de leveduras

Para a realização dos testes foram empregadas as cepas ATCC de *Candida albicans* 90028, *C. krusei* 6258, *C. parapsilosis* 22019, *Candida glabrata* 90030, *Candida tropicalis* 750 e *Cryptococcus neoformans* 90012 (The American Type Culture Collection), pertencente à micoteca do Laboratório de Micologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Araraquara. As cepas foram cultivadas em ágar Sabouraud sem a adição de cloranfenicol e incubadas a temperatura ambiente durante 48 horas.

3.5.2 Preparo das substâncias vegetais

Os extratos e frações de *Kalanchoe gastonis-bonnierei* e de *Kalanchoe pinnata* foram obtidos da mesma forma que os obtidos para a realização das técnicas cromatográficas.

Os extratos e frações obtidos foram diluídos assepticamente em quantidades adequadas de dimetilsulfóxido e solubilizados com o auxílio de vórtex. Essas amostras foram dispostas nas microplacas utilizando-se diluição seriada na proporção 1:2, de modo que as concentrações variassem entre 250 e $0,49\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.5.3 Avaliação da atividade antifúngica

Os testes de sensibilidade foram realizados de acordo com o documento M27-A2 Suplemento 3 do CLSI com modificações (RODRIGUEZ-TUDELA et al., 1996), o qual determina a utilização da técnica de diluição em micro-placa (Figura 7). O meio de cultura a ser utilizado para a realização dos testes de sensibilidade e diluição das drogas sintéticas foi o RPMI-1640 com L-glutamina sem bicarbonato de sódio e acrescido de 2% de glicose, tamponado com MOPS 0,165M, pH 7,0. A concentração da suspensão fúngica foi calculada utilizando-se contagem em câmara de Neubauer, na qual foi determinado o inóculo (10^3UFC mL^{-1}). Como controles foram utilizadas as drogas sintéticas anfotericina B e fluconazol. As leituras visuais foram realizadas após 48 horas de incubação, assim como a leitura espectrofotométrica a 490nm. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi considerada a menor em que se observa inibição do crescimento fúngico. Os extratos que apresentaram uma CIM menor que $75\mu\text{g/mL}$, a atividade antifúngica foi considerada forte, entre 75 a $150\mu\text{g/mL}$ possuem atividade antifúngica moderada, entre 150 a $250\mu\text{g/mL}$, fraca e maior que $250\mu\text{g/mL}$ inativo (SCORZONI et al., 2007).

Como drogas controles, utilizou-se fluconazol e anfotericina B, bem como *Candida parapsilosis* foi utilizada como cepa controle já que existem valores de referência para garantir que a metodologia e a concentração do inóculo foram realizados corretamente.

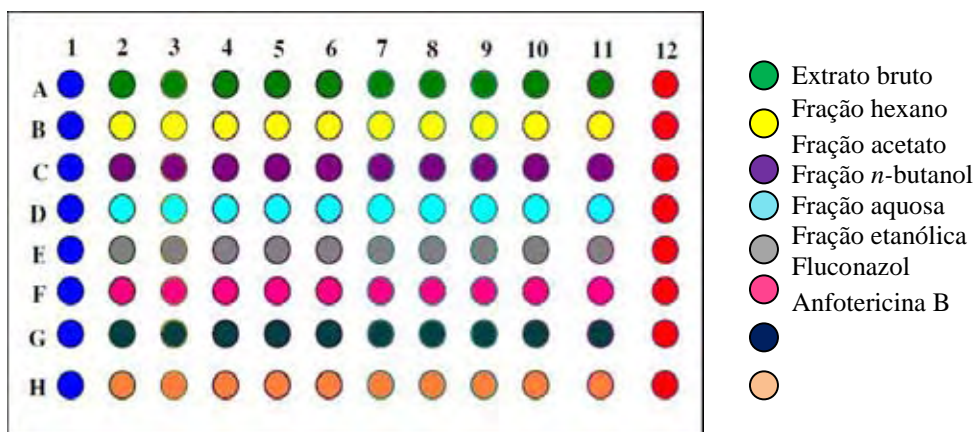


Figura 7: Montagem da micro-placa para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos e frações de *Kalanchoe gastonis-bonnieri* e *Kalanchoe pinnata*. 1 A-H: Controle negativo; 2-11 A-H: Diferentes concentrações dos extratos e frações testados; 12 A-H: Controle positivo.

Para a determinação da concentração fungicida mínima (CFM), uma alíquota de cada poço da micro-placa foi inoculada em placas de petri contendo meio Agar Sabouraud, sendo incubadas por 24 horas a 35°C, observando-se o crescimento de colônias. A CFM foi considerada a menor concentração de extrato ou fração em que não houve o crescimento das colônias.

4. Resultados e discussão

4.1 Determinação das características físico-químicas do pó das folhas

Os dados obtidos com a realização de testes para a caracterização físico-química das drogas vegetais encontram-se na Tabela 3.

Tabela 3: Parâmetros físico-químicos de qualidade das drogas vegetais obtidas a partir de folhas de *Kalanchoe gastonis-bonnieri* e *Kalanchoe pinnata*.

Característica físico-química	<i>Kalanchoe gastonis-bonnieri</i>	<i>Kalanchoe pinnata</i>
Tamanho médio de partícula	0,5647mm±0,0015mm	0,5571mm±0,0088mm
Densidade	0,4790g mL ⁻¹ ±0,0163g mL ⁻¹	0,4584g mL ⁻¹ ±0,005g mL ⁻¹
Resíduo sólido do vegetal fresco	3,81%±0,51%	4,21%±0,10%
Perda por dessecação	9,23%±0,43%	10,70%±0,26%
pH	6,255±0,008	6,200±0,095
Cinzas totais	22,25%±0,99%	19,75%±0,25%
Cinzas insolúveis em ácido	0,38%±0,07%	0,33%±0,03%
Teor de extrativos	37%±1%	40,66%±0,58%

O tamanho das partículas é um parâmetro importante, visto que partículas grandes prejudicam o processo extrativo por dificultarem a penetração do solvente através dos tecidos vegetais. Não há um tamanho ideal para as partículas já que tecidos de diferentes composições podem gerar partículas com tamanhos e cizalhamento diferentes. Tecidos mais rígidos dificultam a penetração do solvente e por isso as partículas devem ser menores.

Todavia, partículas muito pequenas podem entupir os filtros utilizados para separar a solução extrativa do pó da droga vegetal. Por essa razão, é importante conhecer a distribuição do tamanho de partículas e não somente seu tamanho médio. Essa distribuição pode ser visualizada nas Figuras 8 e 9. Ambas as figuras mostram que há maior quantidade de partículas que apresentam maior tamanho. Por se tratar de folhas, ou seja, por ser um tecido de menor rigidez, este fato deve ter pouca influência no processo extrativo, indicando que o processo de moagem pode ser otimizado quanto às características dos elementos de corte do moinho de facas, como por exemplo a diminuição da distância entre os fios de corte das facas. A substituição da tela uniformizadora de partículas por uma de menor abertura também pode melhorar o processo, porém aumenta a permanência do material por mais tempo na câmara de moagem, a qual pode ter sua temperatura aumentada pelo aumento da fricção e atrito das partículas em movimento.

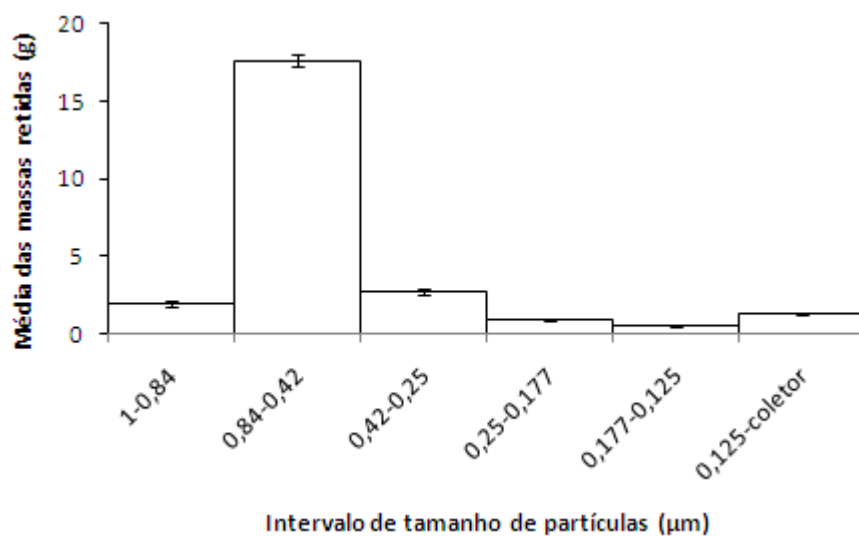


Figura 8: Distribuição do tamanho das partículas da droga vegetal obtida de folhas de *Kalanchoe gastonis-bonnierei*.

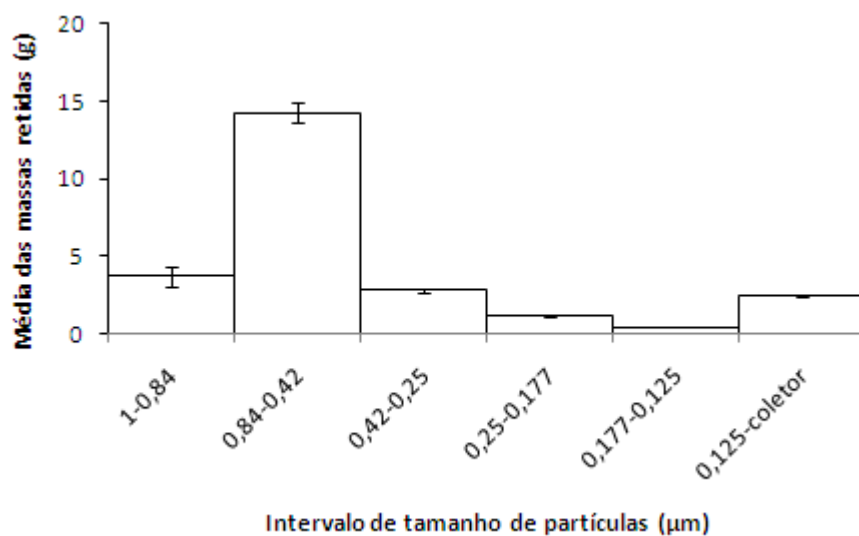


Figura 9: Distribuição do tamanho das partículas da droga vegetal obtida de *Kalanchoe pinnata*.

A determinação da perda por dessecação mostrou que a droga vegetal apresenta valores dentro dos parâmetros com relação à umidade, que deve variar de 8 a 14%, indicando que a secagem foi eficiente. Valores maiores que esses podem permitir o crescimento de micro-organismos e a ação de enzimas, que degradariam a droga vegetal.

Já o resíduo sólido do vegetal fresco indica haver grande quantidade de água no vegetal (cerca de 96%). Por isso, é importante observar que as folhas destas espécies devem ser submetidas à secagem o quanto antes, considerando-se o momento da colheita, garantindo assim a pronta estabilização de possíveis reações de degradação metabólica dos princípios ativos. Contudo, essa secagem não deve ser efetuada em temperaturas elevadas por não se conhecer a termolabilidade dos metabólitos secundários. Sugere-se, portanto, o uso de estufas com circulação de ar, pois nestas o ar saturado é constantemente insuflado para o exterior da câmara de secagem, acelerando o processo.

O valor pH das soluções extrativas na determinação do pH estão acima do valor da água purificada utilizada para realizar a infusão (5,630), sugerindo a presença de compostos alcalinos na droga vegetal.

O teor de cinzas indica a quantidade de minerais existentes na droga vegetal, seja na forma de materiais estranhos ou minerais acumulados pela planta para seu crescimento. Já as cinzas insolúveis em ácido determinam a quantidade de substâncias estranhas minerais presentes na droga vegetal, principalmente partículas de solo depositadas sobre as superfícies. Os valores encontrados foram bastante reduzidos (menores que 0,4%), indicando que o processo de limpeza pós-colheita foi suficiente.

4.2 Triagem fitoquímica preliminar

Os resultados da triagem fitoquímica preliminar estão expostos na Tabela 4.

Tabela 4: Triagem fitoquímica preliminar das drogas vegetais originadas de *Kalanchoe gastonis-bonnierei* e de *Kalanchoe pinnata*.

Metabólito secundário	<i>Kalanchoe gastonis-bonnierei</i>	<i>Kalanchoe pinnata</i>
Saponinas	-	-
Taninos	-	+
Flavonoides	-	+
Antraquinonas	-	-
Glicosídeos cardiotônicos	-	+
Alcaloides	-	-
Cumarinas	-	-
Metilxantinas	-	-

Os resultados dos testes para *K. gastonis-bonnierei* foram negativos para todas as classes de metabólitos secundários, estando em desacordo com os resultados dos testes histoquímicos. Falkenberg et al. (2004) afirmam que é possível haver interferência nos testes quando se utiliza um extrato bruto, sendo que, nestes casos, deve-se proceder a análises após o fracionamento.

Outra possível justificativa é considerar a pequena concentração dos metabólitos secundários de modo que os testes farmacognósticos não sejam sensíveis o suficiente para detectá-los, devendo-se utilizar técnicas mais sensíveis, tais como a cromatografia.

O processo de secagem pode ter degradado os compostos secundários, porém foi conduzido a 40°C e pelo tempo estritamente necessário para a secagem, seguindo-se as recomendações da literatura (MELO et al., 2004).

Em *K. pinnata*, os testes foram positivos para taninos, flavonoides e glicosídeos cardiotônicos. A ocorrência de glicosídeos cardiotônicos já havia sido descrita por Smith (2004), bem como a ocorrência de flavonoides por Muzitano et al. (2006) e Muzitano et al. (2009).

Deve-se fazer a ressalva de que os glicosídeos cardiotônicos geralmente possuem índice terapêutico bastante baixo, tendo potencial como agente tóxico fatal. Por essa razão, a utilização desta planta na medicina popular não deve ser indicada antes que sejam realizados testes toxicológicos que garantam sua segurança ou, ainda, que tais compostos sejam isolados e não façam parte do conjunto de substâncias a serem utilizadas pelo indivíduo, sendo que este processo deve ser realizado por profissionais capacitados.

4.3 Cromatografia em camada delgada

A cromatografia permite a separação das substâncias antes da reação com o reagente específico para cada classe de metabólitos. Além disso, é um método de baixo custo e rápida execução, cujo uso é bastante difundido nos diversos laboratórios de pesquisa e análises (POOLE, 2003).

Em cromatografia em camada delgada, que utiliza mecanismo de adsorção, essa separação se dá em razão da polaridade dos compostos a serem separados e sua interação com as fases móvel e estacionária. Em razão da sílica (fase estacionária) ser um componente polar, compostos com maior polaridade tendem a ficar mais retidos na placa e, por isso, apresentam menor fator de retenção (RF). Já compostos mais apolares

tendem a se deslocar mais, ou seja, apresentam maior valor de RF (POOLE & DIAS, 2000).

Da mesma forma, quando se utilizam fases móveis mais polares, os compostos tendem a se deslocar mais na placa e, por essa razão, tendem a apresentar maior RF. Pode-se utilizar desse fato para se adequar a fase móvel quando há compostos que ficam retidos na origem de aplicação.

As análises cromatográficas de *K. gastonis-bonnieri* demonstraram resultados positivos para alcaloides (Figura 10A) e compostos fenólicos (Figura 10B), na fração *n*-butanol; e terpenos (Figura 10C), nas frações *n*-hexano e acetato de etila, resultado este que se relaciona com os testes histoquímicos apresentados no Capítulo 1.

Em virtude da separação dos compostos, foi possível identificar as classes de metabólitos secundários presentes na droga vegetal, corroborando a hipótese de que os resultados negativos na triagem fitoquímica estavam relacionados a interferentes na análise. Com relação à *K. pinnata*, os testes resultaram na presença de compostos fenólicos (Figura 11A) na fração acetato de etila e terpenos (Figura 11B) nas frações *n*-hexano e acetato de etila. Não foi observada a presença de glicosídeos cardiotônicos, os quais podem ter se perdido durante o fracionamento, ou o solvente utilizado na preparação dos extratos (etanol 70%) não foi capaz de extrair essa classe de compostos. Também não foi possível observar a presença dos alcaloides evidenciada nos testes histoquímicos. Com relação ao teste com vanilina sulfúrica, diversas manchas foram identificadas (Figura 12); isso porque este reagente não revela apenas saponinas, mas também diversos outros metabólitos secundários, como terpenoides, taninos e fenilpropanoides (WAGNER et al., 1996; ANGELO & JORGE, 2007).

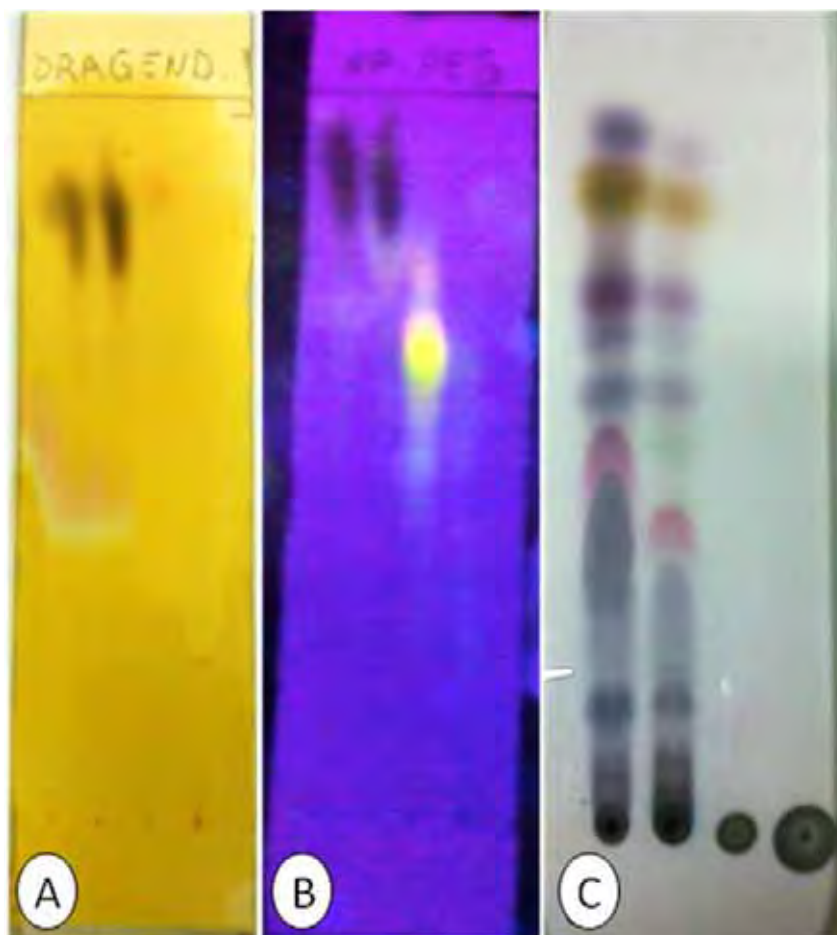


Figura 10: Determinação da presença de metabólitos secundários em *Kalanchoe gastonis-bonnieri* por cromatografia em camada delgada. A: alcaloides na fração *n*-butanol. Revelador reagente de Dragendorff. Rf: 0,81. B: compostos fenólicos na fração *n*-butanol. Revelador NP-PEG. Rf: 0,6. C: terpenos nas frações *n*-hexano e acetato de etila. Revelador anisaldeído sulfúrico. Fase móvel A e B: *n*-butanol:ácido acético:água (65:15:25); C: *n*-hexano:acetato de etila:isopropanol (70:28:2).

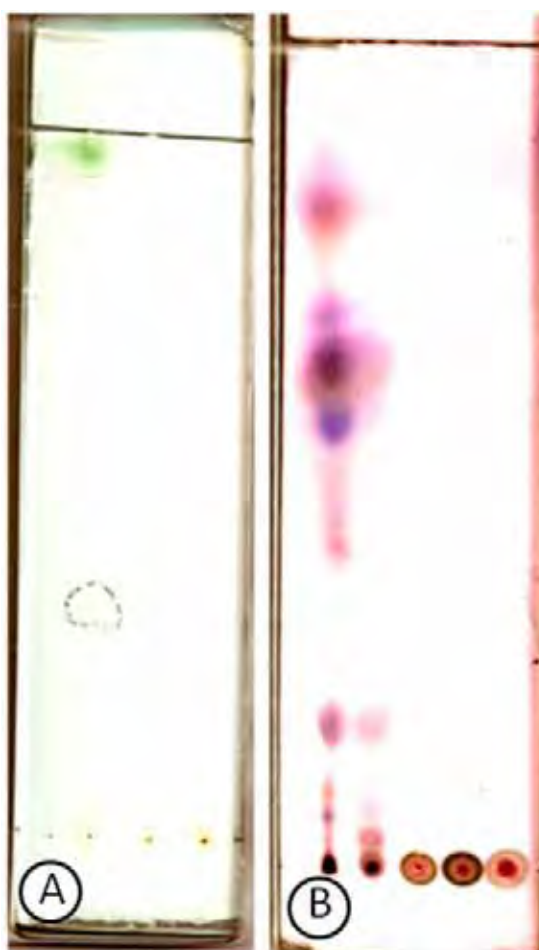


Figura 11: Determinação da presença de metabólitos secundários em *Kalanchoe pinnata* por cromatografia em camada delgada. A: compostos fenólicos na fração acetato de etila. Fase móvel *n*-butanol:ácido acético:água (65:15:25). Revelador NP-PEG. Rf: 0,33. B: terpenos nas frações *n*-hexano e acetato de etila. Fase móvel *n*-hexano:acetato de etila:isopropanol. Revelador anisaldeído sulfúrico.

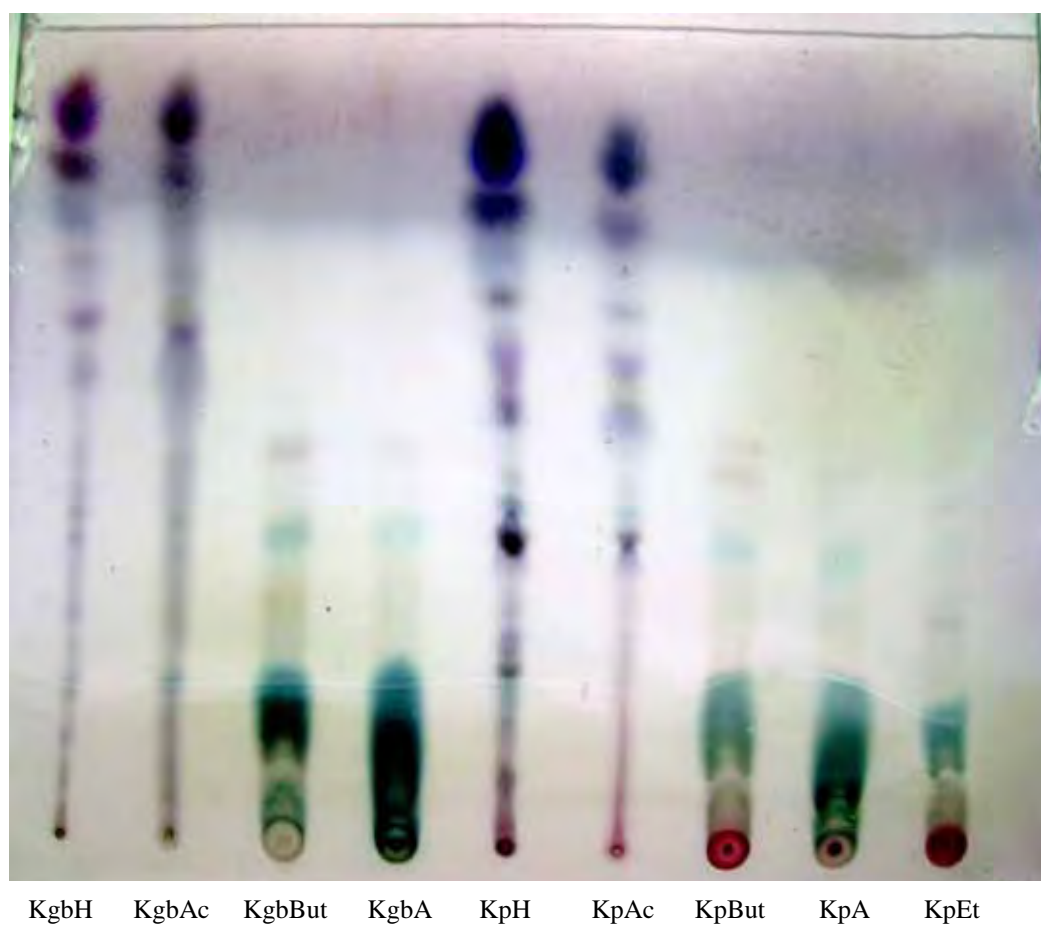


Figura 12: Placa cromatográfica contendo as frações *n*-hexano, acetato de etila, *n*-butanol e aquosa de *Kalanchoe gastonis-bonnierei* e as frações *n*-hexano, acetato de etila, *n*-butanol, aquosa e etanólica de *Kalanchoe pinnata*, revelada com vanilina sulfúrica. Legenda: Kgb – *Kalanchoe gastonis-bonnierei*; Kp – *Kalanchoe pinnata*; H – fração *n*-hexano; Ac – fração acetato de etila; But – fração *n*-butanol; A – fração aquosa; Et – fração etanólica.

4.4 Determinação da atividade antifúngica

Os resultados obtidos após leitura visual das microplacas estão descritos nas Tabelas 5 e 6.

O extrato bruto de *Kalanchoe gastonis-bonnierei* não apresentou atividade fungistática contra *Candida albicans*, apresentou atividade intermediária frente a *Candida glabrata* e *Candida krusei* e forte atividade inibitória contra os demais micro-organismos. Contudo, não houve atividade fungicida frente a nenhum micro-organismo, ou seja, o extrato bruto não foi capaz de matar nenhuma espécie dentre os fungos testados.

Já a fração *n*-hexano não apresentou atividade contra *Candida krusei*, mas teve atividade intermediária contra *Candida albicans* e *Candida glabrata* e boa atividade contra *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*. Com relação à sua atividade fungicida, esta foi forte apenas frente a *Candida tropicalis*, sendo intermediária contra *Candida albicans* e *Candida parapsilosis*.

As frações acetato, *n*-butanol e aquosa não apresentaram nenhuma atividade frente a *Candida albicans* nem contra *Candida tropicalis*. A fração acetato foi a que mostrou melhor atividade já que sua CIM foi a menor frente a *Candida krusei*, *Candida glabrata* e *Cryptococcus neoformans*, bem como apresentou CFM forte contra *Candida parapsilosis*. Contudo, essa fração não foi capaz de matar as espécies *Candida krusei*, *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans*.

A fração aquosa não demonstrou nenhuma atividade, sendo que a fração *n*-butanol apresentou apenas atividade inibitória contra *Candida glabrata* e *Cryptococcus neoformans*, não sendo eficaz em mais nenhuma outra situação testada.

De modo geral, as frações mais apolares foram as que apresentaram melhor atividade, sendo que as substâncias possivelmente ativas presentes nesta espécie vegetal também devem apresentar caráter apolar, enquanto que a fração mais polar não demonstrou nenhuma atividade.

Tabela 5: Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima ($\mu\text{g/mL}$) do extrato bruto de *Kalanchoe gastonis-bonniieri* e suas frações *n*-hexano, acetato de etila, *n*-butanol e aquosa.

	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. neoformans</i>	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Ext. bruto	250	250	125	>250	62,5	250	62,5	250	125	250	31,25	>250
F. <i>n</i> -hexano	125	125	250	>250	62,5	125	125	250	62,5	62,5	31,25	>250
F. acetato	250	250	62,5	>250	62,5	62,5	31,25	250	125	250	31,25	>250
F. <i>n</i> -butanol	250	250	125	>250	125	250	62,5	250	250	250	62,5	>250
F. aquosa	250	250	250	>250	250	250	250	250	250	250	125	>250
Fluconazol	0,5	2	64	>64	2	8	16	64	2	4	4	64
Anfotericina B	0,25	0,5	0,25	1	0,25	0,25	0,5	0,5	1	2	0,0625	8

Tabela 6: Concentração inibitória mínima e concentração fungicida mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato bruto de *Kalanchoe pinnata* e suas frações *n*-hexano, acetato de etila, *n*-butanol, aquosa e etanólica.

	<i>C. albicans</i>		<i>C. krusei</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. neoformans</i>	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Ext. bruto	125	>250	62,5	>250	62,5	>250	31,25	>250	62,5	>250	62,5	250
F. <i>n</i> -hexano	31,25	>250	7,81	>250	31,25	62,5	7,81	>250	31,25	62,5	15,625	31,25
F. acetato	15,625	>250	3,9	>250	7,81	31,25	1,95	>250	31,25	>250	7,81	15,625
F. <i>n</i> -butanol	7,81	>250	3,9	>250	7,81	>250	1,95	62,5	31,25	>250	7,81	7,81
F. aquosa	7,81	>250	3,9	>250	3,9	15,625	1,95	>250	31,25	>250	15,625	7,81
F. etanólica	3,9	>250	0,98	>250	1,95	7,81	0,49	>250	15,625	>250	0,98	0,98
Fluconazol	1	1	64	>64	1	2	8	>64	2	>64	1	2
Anfotericina B	0,25	0,5	0,25	1	0,125	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25	0,125	0,5

A espécie mais susceptível aos tratamentos foi *Cryptococcus neoformans*, espécie causadora de meningoencefalite. Estudo de Park et al (2009) demonstrou que essa levedura afeta um milhão de pessoas por ano, acarretando em 600000 mortes anuais. Scarborough et al (2007) relataram que 40% dos casos de meningite diagnosticados em Malawi são infecções por *Cryptococcus* sp. O gênero *Cryptococcus* está relacionado a infecções em indivíduos imunocomprometidos, porém esta relação não é considerada verdadeira em função de diversos mecanismos de infecção que permitem também a infecção de indivíduos imunocompetentes (KRONSTAD et al., 2011). Por essa razão, é importante buscar terapias adequadas para seu tratamento para, associado à prevenção, promover redução na prevalência e na mortalidade desta doença

Além disso, a purificação do extrato bruto resultou em aumento de atividade de suas frações, de modo que deve-se continuar esta purificação bioguiada.

Com relação a *K. pinnata*, todas as frações apresentaram boa atividade fungistática, impedindo o crescimento de todas as cepas de fungos testadas. A CIM oscilou desde $0,49\mu\text{g mL}^{-1}$ até $31,25\mu\text{g mL}^{-1}$. Esse resultado pode ser explicado pela presença de flavonoides, terpenos e taninos em seu extrato, classes que já demonstraram possuir atividade antimicrobiana (KUREK et al., 2011).

Somente foi verificada atividade fungicida contra *Cryptococcus neoformans* e *Candida parapsilosis*, além das frações *n*-hexano e *n*-butanol, que apresentaram atividade fungicida frente a *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*, respectivamente (CFM= $62,5\mu\text{g mL}^{-1}$).

Novamente, a purificação do extrato bruto levou ao aumento da atividade. Dessa forma, sugere-se que a purificação das substâncias possa levar à determinação de uma substância ativa, a qual poderá vir a ser utilizada na forma de especialidade farmacêutica.

Mesmo os extratos considerados como tendo atividade moderada e fraca podem ser úteis na terapêutica. Muitos óleos essenciais utilizados na medicina popular apresentam valores de CIM e CFM maiores que os demonstrados por *K. gatonis-bonnieri* e *K. pinnata* (TYAGI & MALIK, 2010).

Ainda, saponinas isoladas de *Solanum chrysotrichum*, ativas contra *Candida* sp. também apresentam CIM e CFM maiores que os encontrados neste estudo. Apesar de os autores considerarem esses valores como altos para o uso dessas moléculas como fármaco único, seu uso concomitante com outros é sugerido em função de haver sinergismo com outras moléculas ativas encontradas na mesma espécie vegetal (HERRERA-ARELLANO et al., 2007).

Em virtude da dificuldade de se obter fármacos com atividade antifúngica, sugere-se a realização de estudos de sinergismo entre os extratos com atividade fraca e moderada e fármacos já utilizados na terapêutica, como azóis e anfotericina B, visando à potencialização da atividade.

5. Conclusão

Os testes de caracterização físico-química contribuíram para a elaboração de monografias para estas espécies vegetais, garantindo a identidade e qualidade do material utilizado para a preparação dos medicamentos. Para isso, deve-se estudar espécies coletadas em diversas épocas do ano e locais de cultivo para que todas as variações relacionadas à aclimação e à sazonalidade sejam consideradas quando da construção da monografia.

Os testes químicos evidenciaram a ocorrência de diversas classes de metabólitos secundários, as quais já foram estudadas e demonstraram possuir efeitos biológicos de interesse, justificando o estudo de novas ações farmacológicas para essas espécies vegetais. A presença de glicosídeos cardiotônicos deve ser vista com cautela já que pode ser um indício de toxicidade por parte de *K. pinnata*. Por isso, sugere-se a realização de estudos de identificação e isolamento desses compostos, os quais podem ser estudados para utilização em indivíduos com insuficiência cardíaca.

Tanto *K. gastonis-bonnierii* quanto *K. pinnata* apresentaram atividade antifúngica de acordo com a metodologia utilizada, principalmente atividade fungistática no caso de *K. pinnata*. Para as duas espécies, a cepa fúngica mais susceptível foi *C. neoformans*, a qual está dispersa por todo o mundo e afeta grande parcela da população, de modo a justificar o investimento em estudos que possam levar a um medicamento para tratar esse problema de saúde pública.

Este estudo contribuiu, ainda, para aumentar o espectro de ação de *K. pinnata*, incluindo cepas fúngicas susceptíveis a seu extrato, bem como *K. gastonis-bonnierii* surge como uma nova opção para estudos visando à produção de medicamentos antifúngicos.

4. Considerações finais

O estudo das plantas medicinais é uma atividade multidisciplinar e deve ser considerada sob vários aspectos para garantir que a população terá acesso a formas de tratamento de qualidade, pois a manutenção da saúde é uma das principais preocupações do ser humano.

Por essa razão, foram estudados os primeiros aspectos para a utilização de duas plantas medicinais úteis para o tratamento de doenças fúngicas que afetam tanto indivíduos imunocomprometidos quanto saudáveis.

A identificação botânica é importante para que não haja equívocos na elaboração de preparados ou medicamentos, exemplo que pode ocorrer com as espécies estudadas. Se houver a troca de *K. gastonis-bonnierii* por *K. pinnata* corre-se o risco de expor o usuário à ação de glicosídeos cardiotônicos, os quais apresentam toxicidade.

Garantir a qualidade das drogas vegetais também é importante, tanto para proteger o usuário do medicamento, quanto a própria empresa que preparará a formulação sendo possível a adulteração das matérias-primas de origem vegetal. Por isso, garantir que todas as etapas de processamento pós-colheita sejam adequadamente realizadas é um aspecto importante da cadeia produtiva.

A atividade antimicrobiana foi estudada e mostrou-se que as espécies vegetais apresentam boa atividade contra diversas cepas de fungos. Ainda, esta atividade parece estar relacionada com a presença de terpenos no caso de *K. gastonis-bonnierii*, já que estes estavam presentes nas frações mais ativas. A presença de terpenos também pode justificar a atividade de *K. pinnata*.

A presença de metabólitos secundários que apresentam boa atividade, associada à obtenção de drogas vegetais de qualidade e a possibilidade de realização de testes simples e de baixo custo para auxiliar na identificação destas espécies vegetais são motivos que justificam a continuidade dos estudos, podendo levar ao desenvolvimento de medicamentos que podem ser úteis na terapêutica auxiliando no combate a infecções fúngicas relacionadas a micro-organismos resistentes aos tratamentos convencionais.

Além disso, a descrição de atividade antifúngica com espécies inéditas é uma esperança para o desenvolvimento de novos medicamentos antifúngicos com novos mecanismos de ação e, portanto, inovadores e úteis na terapêutica.

5. Referências

- ALBUQUERQUE, U. P.; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, supl, p. 678-689. 2006.
- AKINSULIRE, O.R.; AIBINU, I. E.; ADANIPEKUN, T.; ADELOWOTAN, T.; ADUGBEMI, T. In vitro antimicrobial activity of crude extracts from plants *Bryophyllum pinnatum* and *Kalanchoe crenata*. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines**, v.4, n. 3, p. 338-344. 2007.
- AMOSTRAGEM. **Métodos de farmacognosia**. In: FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pte. I, p. v.4.2.1.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**. v. 66, n. 1, p. 232-240. 2007.
- ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR, L.V. **Farmacotécnica**: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. São Paulo: Premier, 2000. 177p.
- ARIF, T.; BHOSALE, J. D.; KUMAR, N.; MANDAL, T. K.; BENDRE, R. S.; LAVEKAR, G. S.; DABUR, R. Natural products – antifungal agents derived from plants. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 7, p. 621-638. 2009.
- ASCENSÃO, L. **Técnicas histoquímicas convencionais de microscopia de fluorescência aplicadas em espécies de Cerrado**. Botucatu: IB-UNESP, 2003. 20 p.
- AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.162-168, 177-184.
- BALICK, M. J.; KRONENBERG. F.; OSOSKI, A. L.; REIFF, M.; FUGH-BERMAN, A., O’CONNOR, B.; ROBLE, M.; LOHR, P.; ATHA, D. Medicinal plants used by latino healers for women’s health conditions in New York City. **Economic Botany**, v. 54, n. 3, p.344-357. 2000.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, K. C. P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; DA-CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n. 2, p. 258-285. 2006.
- BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas no Brasil**. Viçosa-MG, UFV: Imprensa Universitária, 1991. v. 2, 377 p.
- BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA – Resolução da Diretoria Colegiada – RDC 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Brasília, DF, 2010.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS: Atitude de Ampliação de Acesso. Brasília, DF, 2006b.

CAIN, A.J. The use of Nile blue in the examination of lipids. **Quarterly Journal of Microscopical Science**, v.88, p.383-392, 1947.

COSTA, A.F. **Farmacognosia: farmacognosia experimental**. 3. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2001. v. 3, p. 303, 308-309.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 4, p. 564-582. 1999.

CRUZ, E. A.; REUTER, S.; MARTIN, H.; DEHZAD, N.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S.; BOSSI-BERGMANN, B.; BUHL, R.; STASSEN, M.; TAUBE, C. *Kalanchoe pinnata* inhibits mast cell activation and prevents allergic airway diseases. **Phytotherapy. Article in Press**, 2011.

CUENDE, E.; BARBADILLO, C.; E-MAZZUCHELLI, R.; ISASI, C.; TRUJILLO, A.; ANDRÉU, J. L. *Candida* arthritis in adult patients who are not intravenous drug addicts: report of three cases and review of the literature. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 22, n. 4, p. 224-241. 1993.

DAS, I.; NIGHTINDALE, P.; PATEL, M.; JUMAA, P. Epidemiology, clinical characteristics, and outcome of candidemia: experience in a tertiary referral center in the UK. **International Journal of Infectious Disease. Article in Press**, 2011.

DAVID, R.; CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences Paris**, v. 258, p.1338-1340, 1964. (Série D)

DE-PAIVA, L. S.; NOBREGA, A.; DE-MELO, G.; HAYASHI, E. A.; CARVALHO, V.; RODRIGUES-E-SILVA, P. M.; BELLIO, M.; TEIXEIRA, G. P.; RUMJANEK, V.; COSTA, S. S.; KOATZ, V. L. G. Selective blockade of lymphopoiesis induced by kalanchosine dimalate: inhibition of IL-7-dependent proliferation. **Journal of Leukocyte Biology**, v.83, p.1038-1048. 2008.

DETERMINAÇÃO do resíduo sólido de vegetal fresco. Métodos de preparação de forma farmacêutica básica. In: FARMACOPEIA HOMEOPÁTICA BRASILEIRA. Métodos gerais. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1997. parte. I, p. X-1.

FALCÃO, H. S.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 4, p. 381-391. 2005.

FALKENBERG, M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2001.

FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pte. I, p. v.2.9., v.2.11., v.2.19., v.2.19.2., v.4.2.1., v.4.2.3., v.4.2.4., v.4.2.5.

FARMACOPÉIA brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

FARMACOPÉIA brasileira. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FARMACOPEIA brasileira. 5 ed. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/pdf/volume1%2020110216.pdf>. Acesso em 24 de março de 2011.

FERREIRA, A. C. F.; ROSENTHAL, D.; CARVALHO, D. P. Thyroid Peroxidase Inhibition by *Kalanchoe brasiliensis* Aqueous Extract. **Food and Chemical Toxicology**. v. 38, p. 417-421. 2000.

FISCHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, v. 16, p. 92-96, 1968.

FRIDKIN, S. K. ; GAYNES, R. P. Antimicrobial resistance in intensive care units. **Clinics in Chest Medicine**. v. 20, n. 2, p. 303-316. 1999.

GABE, M. **Techniques histologiques**. Paris: Masson e Cie, 1968. p. 1113.

GANTER, P.; JOLLÉS, G. **Histochimie normale et pathologique**. Paris: Gauthier, Villars. 1969-1970. v. 2.

GEISSMAN, T.A.; GRIFFIN, T.S. Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid structure determination. **Phytochemistry**, v.10, p. 2475-2485, 1971.

GOMES, D. C. O.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S.; ROSSI-BERGMANN, B. Effectiveness of the immunomodulatory extract of *Kalanchoe pinnata* against murine visceral leishmaniasis. **Parasitology**, v. 137, p. 613-618. 2010.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 2nd ed. London: Chapman and Hill, 1998. 288 p.

HARDMAN, R.; SOFOWORA, E.A. Antimony trichloride as test reagents for steroids, especially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. **Stain Technology**, v. 47, p. 205-208, 1972.

HERRERA-ARELLANO, A.; MARTÍNEZ-RIVERA, M. A.; HERNÁNDEZ-CRUZ, M.; LÓPEZ-VILLEGAS, E. O.; RODRÍGUEZ-TOVAR, A. V.; ALVAREZ, L.; MARQUINA-BAHENA, S.; NAVARRO-GRACÍA, V. M.; TORTORIELLO, J. Mycological and electron microscopic study of *Solanum chrysotrichum* saponin SC-2 antifungal activity on *Candida* species of medical significance. **Planta Medica**, v.73, p. 1568-1573. 2007.

HIGUCHI, C.T. **Byrsonima spp**: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicobacteriana e citotoxicidade de extratos e seus derivados. Araraquara, f.18 Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007

HOOPER, L.; MADHAVAN, G.; TICE, J. A.; LEINSTER, S. J.; CASSIDY, A. Effects of isoflavones on breast density in pre- and post-menopausal women: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Human Reproduction Update**. v.16, n.6, p.745-760. 2010.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry**: principles and practice. San Francisco: WH Freeman, 1962. 408 p.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

JUTIAMORNLERD, N. Epidemiology of candidemia in Songklanagarind Hospital. **Journal of Medical Association of Thailand**. v. 94, n. 8, p. 927-932. 2011.

KAMGANG, R.; MBOUMI, R. Y.; FONDJO, A.F.; TAGNE, M. A. F.; N'DILLÉ, G. P. R. M.; YONKEU, J. N. Antihyperglycaemic potential of the water-ethanol extract of *Kalanchoe crenata* (Crassulaceae). **Journal of Natural Medicine**. v. 62, p. 34-40. 2008.

KOPTUR, S.; TRUONG, N. Facultative ant-plant interactions: nectar sugar preferences of introduced pest ant species in South Florida. **Biotropica**, v. 30, n. 2, p. 179-189. 1998.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. 198 p.

KRONSTAD, J. W.; ATTARIAN, R.; CADIEUX, B.; CHOI, J.; D'SOUZA, C. A.; GRIFFITHS, E. J.; GEDDES, J. M. H.; HU, G.; JUNG, W. H.; KRETSCHMER, M.; SAIKIA, S.; WANG, J. Expanding fungal pathogenesis: *Cryptococcus* breaks out of the opportunistic box. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, p. 193-203. 2011.

KSHIRSAGAR, R. D.; SINGH, N. P. Some less known ethnomedicinal uses from Mysore and Coorg districts, Karnataka state, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 231-238. 2001.

KUREK, A.; GRUDNIAK, A. M.; KRACZKIEWICZ-DOWJAT, A.; WOLSKA, K. I. New Antibacterial Therapeutics and Strategies. **Polish Journal of Microbiology**, v. 60, n. 1, p. 3-12. 2011.

LANS, C. A. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.2, n.45. 2006. Disponível em: <<http://www.ethnobiomed.com/content/pdf/1746-4269-2-45.pdf>>. Acesso em: 24 de março de 2010.

LEWINSOHN, E.; DUDAI, N.; TADMOR, Y.; KATZIR I.; RAVID U.; PUTIEVSKY E.; JOEL, D.M. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citrates* (DC.) Stapf., Poaceae). **Annals Botany**, v. 81, p. 35-39, 1998.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa: Plantarum, 2002. p. 185-186.

MACE, M.E.; HOWELL, C.R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Phytopathology**, v. 64, p.1297-1302, 1974.

MARTINS, A.B.; SACRAMENTO, L.V.S. Análise microscópica e física para controle de qualidade primário de matéria prima vegetal pulverizada. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 16, 2004, Ilha Solteira. **Anais**, Ilha Solteira: UNESP, 2004. (CD ROM)

MELO, E. C.; RADÜNZ, L. L.; ALVARENGA-E-MELO, R. C. Influência do processo de secagem na qualidade de plantas medicinais – revisão. **Engenharia na Agricultura**. v. 12, n. 4, p. 307-315. 2004.

MONTRAVERS, P.; JABBOUR, K. Clinical consequences of resistant *Candida* infections in intensive care. **International Journal of Antimicrobial Agents**. v. 27, p. 1-6. 2006.

MUZITANO, M. F.; TINOCO, L. W.; GUETTE, C.; KAISER, C. R.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 2071-2077. 2006.

MUZITANO, M. F.; FALCÃO, C. A. B.; CRUZ, E. A.; BERGONZI, M. C.; BILIA, A.R.; VINCIERI, F. F.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. Oral Metabolism and Efficacy of *Kalanchoe pinnata* Flavonoids in a Murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. **Planta Medica**, v. 75, p. 307-311. 2009.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standard M27-A2, 2nd ed. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, Wayne, Pa. 2002.

NAYAK, B. S.; MARSHALL, J. R.; ISITOR, G. Wound healing potential of ethanolic extract of *Kalanchoe pinnata* Lam. Leaf: a preliminary study. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 48, p. 572-576. 2010.

NIELSEN, A. H.; OLSEN, C. E.; MOLLER, B. L. Flavonoids in flowers of 16 *Kalanchoe blossfeldiana* varieties. **Phytochemistry**. v. 66, p. 2829-2835. 2005.

OSOSKI, A. L.; LOHR, P.; REIFF, M.; BALICK, M. J.; KRONENBERG, F.; FUGH-BERMAN, A.; O'CONNOR, B. Ethnobotanical literature survey of medicinal plants in the Dominican Republic used for women's health conditions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 285-298. 2002.

PARK, B. J.; WANNEMUEHLER, K. A.; MARSTON, B. J.; GOVENDRER, N.; PAPPAS, P. G.; CHILLER, T. M. Estimations of the current global burden of cryptococcal meningitis among persons living with HIV/AIDS. **AIDS**, v. 23, n. 4, p. 525-530. 2009.

PAVESE, J. M.; FARMER, R. L.; BERGAN, R. C. Inhibition of cancer cell invasion and metastasis by genistein. **Cancer and Metastasis Review**, v. 29, p. 465-482. 2010.

POOLE, C. F.; DIAS, N. C. Practitioner's guide to method development in thin-layer chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 892, p. 123-142. 2000.

POOLE, C. F. Thin-layer chromatography: challenges and opportunities. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 963-984. 2003.

PRASAD, R.; KAPOOR, K. Multidrug Resistance in Yeast *Candida*. **International Review of Cytology**, v.242, p. 215-248. 2005.

RAHMATULLAH, M.; RAHMAN, A.; HOSSAN, M.; TAUFIQ-UR-RAHMAN, M.; JAHAN, R.; MOLLIK, A. H. A pharmacological and phytochemical evaluation of medicinal plants used by the

Harbang Clan of the Tripura Tribal Community of Mirsharai Area, Chittagong District, Bangladesh. **The Journal of Alternative and Complementary Medicine**. v. 16, n. 7, p. 769-785. 2010.

RODRIGUEZ-TUDELA, J.L.; BERENQUER, J.; MARTINEZ-SUAREZ, J.V.; SANCHEZ, R. Comparison of a spectrophotometric microdilution method with RPMI-2% glucose with the National Committee for Clinical Laboratory Standards reference macrodilution method M27-P for in vitro susceptibility testing of amphotericin B, flucytosine, and fluconazole against *Candida albicans*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 40, pp. 1998–2003. 1996.

SCARBOROUGH, M.; GORDON, S. B.; WHITTY, C. J. M.; FRENCH, N.; NJALALE, Y.; CHITANI, A.; PETO, T. E. A.; LALLOO, D. G.; ZIJLSTRA, E. E. Corticosteroids for bacterial meningitis in adults in Sub-Saharan Africa. **The New England Journal of Medicine**, v.357, n. 24, p. 2441-2450. 2007.

SCORZONI, L.; BENADUCCI, T.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; SILVA, D.H.S.; BOLZANI, V.S.; MENDES-GIANNINI, M.J.S. Comparative study of disk diffusion and microdilution methods for evaluation of antifungal activity of natural compounds against medical yeast *Candida* spp. and *Cryptococcus* sp. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 25-34, 2007.

SILVA, K. L.; CECHINEL-FILHO, V. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 449-454. 2002.

SILVA, P. **Farmacologia**. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2006.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/ Ed. da UFSC, 2001.

SMITH, G. *Kalanchoe* species poisoning in pets. **Veterinary Medicine**, p.933-936. 2004. Disponível em: <<http://veterinarymedicine.dvm360.com/vetmed/article/articleDetail.jsp?id=132513>>. Acesso em: 26 de março de 2010.

SOUZA, L. A.; ALBUQUERQUE, J. C. R.; LEITE, M. N.; STEFANINI, M. B. Sazonalidade dos ductos secretores e óleo essencial de *Foeniculum vulgare* var. *vulgare* Mill. (Apiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 15, n. 2, p. 155-161. 2005.

SUPRATMAN, U.; FUJITA, T.; AKIYAMA, K.; HAYASHI, H. New Insecticidal Bufadienolide, Bryophyllin C, from *Kalanchoe pinnata*. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**, 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 *K. daigremontiana* x *tubiflora*. **Bioscience, Biotechnology & Biochemistry**. v.65, n.4, p.947-949. 2001.

SVENDSEN, A.B.; VERPOORTE, R. **Chromatography of alkaloids**. New York: Elsevier, 1983. 276 p.

THE UNITED STATES PHARMACOPEIA. 26th Rockville: United States Pharmacopeial Convection, 2003. p. 1877-1879, 2380.

TILLSON, A. H. The floral anatomy of the Kalanchoideae. **American Journal of Botany**, v.27, n. 8, p. 595-600. 1940.

TORRES-SANTOS, E. C.; DA SILVA, S. A. G.; COSTA, S. S.; SANTOS, A. P. P. T.; ALMEIDA, A. P.; ROSSI-BERGMANN, B. Toxicological analysis and effectiveness of oral *Kalanchoe pinnata* on a human case of cutaneous leishmaniasis. **Phytotherapy Research**, v. 17, p. 801-803. 2003.

TREVISAN, M. T. S.; BEZERRA, M. Z. B.; SANTIAGO, G. M. P.; FEITOSA, C. M.; VERPOORTE, R.; BRAZ-FILHO, R. Atividades larvicida e anticolinesterásica de plantas do gênero *Kalanchoe*. **Química Nova**, v. 29, n. 3, p. 415-418. 2006.

TYAGI, A. K.; MALIK, A. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *Candida albicans*: microscopic observations and chemical characterization of *Cymbopogon citrates*. **BMC Complementary & Alternative Medicine**, v. 10, n. 65. 2010. Disponível em: <http://www.biomedcentral.com/1472-6882/10/65>. Acessado em 30 de outubro de 2011.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528. 2005.

WAGNER, H.; BLADT, S.; RICKL, V. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer Verlag, 1996. 384p.

WERYSZKO-CHMIELEWSKA, E.; CHERNETSKYY, M. Structure of trichomes from the surface of leaves of some species of *Kalanchoë* Adans. **Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica**, v. 47, n. 2, p. 15-22. 2005.

World Health Organization – WHO - **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva: WHO. 2001.