



Abanico Veterinario. Janeiro-Dezembro 2021; 12:1-16. <http://dx.doi.org/10.21929/abavet2022.1>  
Comunicação curta. Recebido:10/02/2021. Aceito:13/12/2021. Publicado:26/01/2022. Chave: e2021-11.  
<https://www.youtube.com/watch?v=5QEit7OKOWc>

## Efeito anti-helmíntico e antibacteriano *in vitro* do extracto hidroalcoólico de folhas e caules de *Kalanchoe daigremontiana*

*In vitro* anthelmintic and antibacterial effect of *Kalanchoe daigremontiana* leaves and stems hydroalcoholic extract

Nallely Rivero-Pérez<sup>1</sup> , Judith Prieto-Méndez<sup>2</sup> , Alma Hernández-Fuentes<sup>3</sup> ,  
Adrián Zaragoza-Bastida\*<sup>1</sup> , Alfredo Madariaga-Navarrete\*\*<sup>2</sup> 

<sup>1</sup>Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia, México. <sup>2</sup>Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuaria, Área Académica de Ciencias Agrícolas y Forestales. <sup>3</sup>Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias. Área Académica de Agronegocios e Ingeniería en Alimentos. \*Autor para correspondência: Adrián Zaragoza-Bastida. \*\*Autor responsável: Alfredo Madariaga-Navarrete. Rancho Universitario Av. Universidad km 1, A.P. 32 CP.43600. 01771717 2000 ext. 2440. Ex-Hda. de Aquetzalpa, Hidalgo, México. E-mail: nallely\_rivero@uaeh.edu.mx, jprieto@uaeh.edu.mx, almah@uaeh.edu.mx, adrian\_zaragoza@uaeh.edu.mx, alfredo\_madariaga@uaeh.edu.mx

### RESUMO

Cinco concentrações (200 a 12,5 mg mL<sup>-1</sup>) do extracto hidroalcoólico de *Kalanchoe daigremontiana* foram utilizadas para determinar o seu efeito anti-helmíntico e antibacteriano *in vitro*. Para determinar o efeito anti-helmíntico, foram realizados testes de inibição de eclosão, inibição de motilidade e mortalidade larvar em *Haemonchus contortus* (HC). A determinação da Concentração Inibitória Mínima e da Concentração Bactericida Mínima permitiu a avaliação da actividade antibacteriana do extracto em *L. monocytogenes*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*, *B. subtilis*, *E. coli* e *S. aureus*. O extracto hidroalcoólico de *Kalanchoe daigremontiana* a 400 mg mL<sup>-1</sup> inibiu a eclosão dos ovos de HC em 99,5%, e reduziu a motilidade de 85,2% das larvas de L3 do mesmo nemátodo. As concentrações de 50 e 90 concentrações letais para inibição de eclosão foram 66,5 e 87,3 mg mL<sup>-1</sup> e 1,5 e 240,9 mg mL<sup>-1</sup>, para inibição da motilidade. O extracto mostrou actividade nas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, determinando um CIM de 100 mg mL<sup>-1</sup> em *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes* e 0,781 mg mL<sup>-1</sup> para *B. subtilis* e *S. aureus*. Estes resultados indicam que o extracto hidroalcoólico de *Kalanchoe daigremontiana* tem um potencial efeito anti-helmíntico e antibacteriano e poderia ser utilizado como estratégia de controlo biológico.

**Palavras-chave:** *Kalanchoe daigremontiana*, extracto hidroalcoólico, anti-helmíntico, antibacteriano

### ABSTRACT

Five concentrations (200 to 12.5 mg mL<sup>-1</sup>) of *Kalanchoe daigremontiana* hydroalcoholic extract, were used to determine its anthelmintic and antibacterial effect *in vitro*. To determine the anthelmintic effect, eggs hatching inhibition, inhibition of motility and larval mortality tests were performed *Haemonchus contortus* (HC). The determination of the Minimum Inhibitory Concentration and Minimum Bactericidal Concentration allowed to evaluate the antibacterial activity of extract on *L. monocytogenes*, *S. typhi*, *P. aeruginosa*, *S. choleraesuis*, *B. subtilis*, *E. coli* and *S. aureus*. *Kalanchoe daigremontiana* hydroalcoholic extract inhibited the 99.5% of HC eggs hatching and reduced the motility of 85.2% of L3 larvae at 400 mg mL<sup>-1</sup>. The lethal



concentrations 50 and 90 for the inhibition of hatching were 66.5 and 87.3 mg mL<sup>-1</sup> and 1.5 and 240.9 mg mL<sup>-1</sup>, for the inhibition of motility. The extract showed activity on Gram positive and Gram-negative bacteria, determining a MIC of 100 mg mL<sup>-1</sup> on *P. aeruginosa* and *L. monocytogenes* and 0.781 mg mL<sup>-1</sup> for *B. subtilis* and *S. aureus*. These results indicate that the hydroalcoholic extract of *Kalanchoe daigremontiana* has a potential anthelmintic and antibacterial effect and that it could be used as a biological control strategy.

**Keywords:** *Kalanchoe daigremontiana*, hydroalcoholic extract, anthelmintic, antibacterial.

## INTRODUÇÃO

O México Central é uma área bem conhecida da criação de ovinos, principalmente para o mercado de carne. O rendimento e a qualidade da carne, e portanto a viabilidade económica da indústria, dependem da saúde dos animais. A produção de ovinos requer uma vigilância contínua para a infecção por nemátodos parasitas, uma vez que a sua presença tem impacto na produtividade da carne [Alcala et al., \(2016\)](#). Os vermes abomasais, especialmente o *Haemonchus contortus* [verme do pólo do barbeiro; Nematoda: Strongylida] [\(Aguilar et al., 2016; Castillo et al., 2017\)](#) são os principais nematódeos causadores de doenças gastrointestinais dos ovinos no México. Vários produtos anti-helmínticos têm sido utilizados para resolver este problema, muitos dos quais têm sido relatados como causadores de resistência [\(González et al., 2017\)](#). Por outro lado, a medicina tradicional em veterinária, especialmente a utilização de extractos de plantas, foi proposta como uma alternativa amiga do ambiente contra esta infecção parasitária [\(Hernández et al., 2011; López et al., 2008; Abdelfatta et al., 2017\)](#).

A utilização de plantas como agentes anti-helmínticos está bem documentada. Entre as espécies utilizadas para este fim encontram-se *Chenopodium album* [\(Bashir et al., 2017\)](#), *Digitaria insularis* [\(Santos et al., 2017\)](#), *Artemisa parviflora* [\(Irum-S et al., 2017\)](#), *Ziziphus jujube* [\(Preet et al., 2017\)](#), *Acacia cochliacantha* *Argemone mexicana*, *Taraxacum officinale*, *Ruta chalepensis*, e *Tagetes filifolia* [\(Olmedo et al., 2017\)](#). *Kalanchoe daigremontiana* (também conhecida como "mãe de milhares") é uma planta endémica no México [\(Kolodziejczyk et al., 2017\)](#) com vários usos relatados na medicina herbal humana [\(Hamburger et al., 2017\)](#) e vários compostos activos foram encontrados nos extractos das folhas e caules desta planta em particular [\(Huang et al., 2013\)](#). Há relatórios sobre a utilização da *K. daigremontiana* como um agente antimicrobiano. Seguem-se alguns dos géneros *Kalanchoe* compostos isolados e funções (Tabela 1). Portanto, este estudo teve como objectivo avaliar a capacidade anthelmíntica e antibacteriana de um extracto hidroalcoólico de *K. daigremontiana*.



## MATERIAIS E MÉTODOS

**Recolha de material vegetal e identificação de espécies:** Os espécimes de *K. daigremontiana* foram recolhidos em Ulapa de Melchor Ocampo, Tetepango, Hidalgo, no México Central (latitude 20.142500, longitude -99.167778). Os habitantes locais têm usado tradicionalmente esta planta como medicamento herbal. Plantas inteiras (raízes, folhas e caules) eram colhidas na fase fenológica da floração e preparadas para o transporte. A identificação das espécies era feita no laboratório de botânica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Autónoma do Estado de Hidalgo. Um exemplar representativo do material vegetal foi depositado no herbário do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Autónoma do Estado de Hidalgo, e foi-lhe atribuído o código de identificação 06.

**Tabela 1. Compostos isolados e funções de algumas plantas dos géneros *Kalanchoe***

Espécies	Compostos Isolados	Função	Referência
<i>Kalanchoe pinnata</i>	KPB-100 and KPB-200	inibidores de HHV-2 e VACV	<a href="#">Cryer et al., 2017</a>
<i>Kalanchoe pinnata</i>	Rodiolosídeos. C	Inseticida	<a href="#">Supratman et al., 2000</a>
<i>Kalanchoe daigremontiana</i> <i>x tubiflora</i>	Daigremonato de metilo	Inseticida	<a href="#">Supratman et al., 2001</a>
<i>Kalanchoe daigremontiana</i> <i>butiflora</i>	x Rodiolosídeos A	Atividade de promoção anti-tumor	<a href="#">Supratman et al., 2001</a>
<i>Kalanchoe prolifera</i>	Caempferol, Quercetin, Quercetin-3-O-β-D-glucopiranoside, Caempferol-3-O-β-D-glucopiranoside, Caempferol-3-O-α-L-rhamnoside, Quercetin-3-O-sophoraside, Quercetin-3-O-rutinoside, Quercetin-3-O-rutinoside	Atividade citotóxica contra células de leucimia	<a href="#">Aisyah et al., 2017</a>
<i>Kalanchoe pinnata</i>	Flavonóides em extracto de metanol	Atividade anti-diabética <i>in vitro</i>	<a href="#">George et al., 2018</a>
<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	11α,19-dihidroxitocítocitelocinobufagina, bersaldegenina-1-acetato, bersaldegenina-1, 3,5-ortoacetato,	Antioxidante	



	19-acetiloxi-11 $\alpha$ -hidroxi-12-oxo-oxo-telocinobufagina, 19-acetiloxi-1 $\beta$ -hidroxicitóxitelocinobufagin		Kolodziejczyk-Czepas <i>et al.</i> , 2016
<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Bufadienóis como 11 $\alpha$ , 19-di-hidroksitroksitelocinobufagina, bersaldegenina-1-acetato, daigredorigenina-3-acetato,	Inibição da atividade amidolítica da trombina	Kolodziejczyk-Czepas <i>et al.</i> , 2017
<i>Kalanchoe daigremontiana</i>	Bersaldegenina-1,3, 5-ortoacetato	Aumento da apoptose nas células deterioradas e promoção da morte celular	Stefanowicz-Hajduk <i>et al.</i> , 2020
<i>Kalanchoe pinnata</i>	Quercitrina	Atividade antileishmania	Muzitano <i>et al.</i> , 2006
<i>Kalanchoe thrysiflora</i> , <i>Kalanchoe marmorata</i>	3-oxo-olean-12-ene, $\beta$ -sitosterol	Actividade citotóxica selectiva em células MCF7	Singab <i>et al.</i> , 2012
<i>Kalanchoe tubiflora</i>	Dimalato de calancosina	Atividade citotóxica	Huang <i>et al.</i> , 2013
<i>Bryophyllum pinnatum</i>	Bersaldegenina-1,3,5-ortoacetato	<i>In Vitro</i> enzimas de inibição da atividade, para os fármacos modernos	Prasad Pandey <i>et al.</i> , 2020

**Preparação do extracto:** Cem gramas de folhas secas e vapores (4-6 mm) foram macerados com 3000 mL de solvente de extracção (30% metanol, 70% água); após 72 h, o extracto foi separado do resíduo sólido utilizando um papel filter (Whatman™ qualitativo, papel grau 1), e o solvente foi removido por destilação sob pressão reduzida num evaporador rotativo BÜCHI™ R-210 (Flawil, Alemanha), seguindo a metodologia descrita por Rivero-Pérez *et al.*, (2016). As concentrações avaliadas para eclosão de ovos e inibição da mobilidade larvar, bem como a mortalidade larvar, foram de 200, 100, 50,



25, e 12,5 mg mL<sup>-1</sup>. Extractos secos (35 g) foram armazenados a -20 °C até serem utilizados.

### Atividade anti-helmíntica

Foram utilizados ovos de *H. contortus* (HC) e larvas de estágio L3 para avaliar a actividade anti-helmíntica. Os parasitas da estirpe INIFAP foram obtidos do Instituto Nacional de Investigação Florestal, Animal e Agronómica (INIFAP).

### Teste de eclosão dos ovos

Os ovos HC foram obtidos segundo um protocolo aprovado pelo Comité de Bioética do Instituto de Ciências Agrárias da Universidade Autónoma do Estado de Hidalgo. Em resumo, um cordeiro Hampshire (3 meses e 37 kg PV), clinicamente saudável e livre de nemátodos gastrintestinais, foi infestado com larvas de HC L3 (350 larvas kg<sup>-1</sup> PV). Vinte e um dias após a infestação, foram colhidas amostras de fezes e o número de ovos por grama de fezes foi determinado pelo método McMaster (Cordero-Miguel *et al.*, 2000).

Para recuperar os ovos HC, foi seguida a metodologia descrita por Olmedo *et al.*, (2017). Trinta gramas de fezes foram lavadas com água destilada em peneiras de 200-, 100-, 75-, e 37-µm e concentradas na peneira de 37-µm. O material retido na última peneira foi lavado com 6 mL de solução salina saturada e centrifugado a 3000 rpm durante 3 min. O sobrenadante foi descartado, e o sedimento foi lavado três vezes com água destilada para obter ovos livres.

Para o ensaio foi utilizada uma placa ELISA de 96 orifícios. Cada orifício foi adicionado com 150-200 ovos em 50 µL de água destilada e 50 µL de extracto (200, 100, 50, 25, ou 12,5 mg mL<sup>-1</sup>). Cada concentração de extracto foi testada com quatro réplicas, usando Ivermectina (5 mg mL<sup>-1</sup>) e água destilada como controlos positivos e negativos, respectivamente. As placas foram incubadas a 30 °C durante 48 h numa câmara de humidade constante. Após a incubação, foram observadas ao microscópio dez alíquotas de 10-µL para contar o número de ovos e larvas não incubados (mortos ou vivos) por orifício. Finalmente, a percentagem de inibição de incubação de ovos foi calculada utilizando a equação 1.

$$\frac{\text{Número de ovos no orifício}}{\text{Número de larvas L1 + Número de ovos no orifício}} \times 100 \quad (1)$$

### Teste de mortalidade larvar

Fezes de borregos infestados foram misturadas com água destilada e espuma de poliuretano (1,5 × 1,5 × 0,5 cm) e incubadas durante 10 dias à temperatura ambiente (15-20 °C). Após a incubação, as larvas do HC L3 foram recuperadas seguindo a técnica Baermann. As larvas do estágio L3 foram desengorduradas com 3% de hipoclorito de



sódio (NaClO) durante um minuto e lavadas três vezes com água destilada para remover o NaClO residual.

O ensaio foi realizado em placas de 96 orifícios. Cada orifício foi adicionado com 150-200 larvas suspensas em 50 µL de água e 50 µL de extracto de *K. daigremontiana* (200, 100, 50, 25, ou 12,5 mg mL<sup>-1</sup>). Cada concentração de extracto foi testada com quatro réplicas, usando Ivermectina (5 mg mL<sup>-1</sup>) e água destilada como controlos positivos e negativos, respectivamente. As placas foram incubadas numa câmara de humidade constante a 30° C durante 72 h. Após a incubação, foram observadas ao microscópio dez alíquotas de 10 µL para determinar o número de larvas vivas ou mortas por orifício. A taxa de mortalidade para cada concentração de extracto foi determinada usando a equação 2:

$$\frac{\text{Número de larvas mortas no orifício}}{\text{Total de larvas no orifício}} \times 100 \quad (2)$$

### Teste de mobilidade larvar

Para este ensaio, as larvas de HC em fase L3 não aquecidas foram colocadas em placas de 96 orifícios. Cada orifício foi adicionado com 150-200 larvas suspensas em 50 µL de água e 50 µL de extracto (200, 100, 50, 25, ou 12,5 mg mL<sup>-1</sup>). Cada concentração de extracto foi testada com quatro réplicas, usando Ivermectina (5 mg mL<sup>-1</sup>) e água destilada como controlos positivos e negativos, respectivamente. As placas foram incubadas numa câmara de humidade constante a 30° C durante 72 h. Após a incubação, foram observadas ao microscópio alíquotas de 10 µL para determinar o número de larvas vivas/mortas, móveis/imóveis por orifício. A taxa de inibição da motilidade para cada concentração de extracto foi determinada usando a equação 3:

$$\frac{\text{Número de larvas vivas em cada orifício} - \text{Larvas vivas com movimento em cada orifício}}{\text{Número total de larvas em cada poço (vivas e mortas)}} \times 100 \quad (3)$$

### Atividade antibacteriana

Os microrganismos utilizados para determinar a atividade antibacteriana do extracto hidroalcoólico de *K. daigremontiana* foram *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), *Listeria monocytogenes* (ATCC 19113), e *Escherichia coli* (ATCC 35218).

O método da microdiluição do caldo descrito por [Kaewpiboo et al., \(2012\)](#) foi utilizado com algumas modificações para determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do extracto hidroalcoólico de *K. daigremontiana*. Foram preparadas diluições em série duplas do extracto hidroalcoólico de *K. daigremontiana* (de 400 a 0,781 mg mL<sup>-1</sup>) em duplicado (100 µL por orifício). Uma suspensão de células bacterianas foi ajustada para



0,5 unidades McFarland (aproximadamente  $1,5 \times 10^6$  unidades formadoras de colónias [UFC] mL<sup>-1</sup>). Uma alíquota de 10- $\mu$ L foi adicionada a cada orifício. Kanamycin (AppliChem 4K10421™) foi utilizada como controlo positivo ( $64-0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e caldo nutritivo foi utilizado como controlo negativo. As placas foram incubadas a 37 °C sob agitação (70 rpm) durante 24 h.

Após incubação, 20  $\mu$ L de 0,04% (p/v) de solução de p-iodonitrotetrazolium foi adicionado a cada orifício e incubado durante 30 min. Uma mudança na cor de amarelo para rosa indicou a redução do corante devido ao crescimento bacteriano. O CIM foi determinado para cada concentração de extracto como a concentração mais baixa em que não se observou crescimento microbiano, como determinado pela ausência de mudança de cor (Figura 1).

### Análise estatística

Os dados foram analisados através da análise de variância unidireccional e do teste post-hoc Tukey-Kramer ( $\alpha = 0,05$ ). As concentrações que inibiram 50% (CL<sub>50</sub>) e 90% (CL<sub>90</sub>) da eclosão e motilidade dos ovos HC, bem como as que mataram 50 e 90% das larvas, foram calculadas por uma análise PROBIT utilizando o pacote estatístico SAS 9.0.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Atividade anti-helmíntica

A eficácia média do extracto hidroalcoólico de *K. daigremontiana* contra HC é mostrada na Tabela 2. Foi encontrada uma taxa significativamente diferente de inibição de eclosão de ovos (IEH%) em relação aos controlos positivos e negativos ( $P < 0,0001$ ) no intervalo 100-200 mg mL<sup>-1</sup> (99,5%). Por outro lado, a mortalidade (MOR%) também foi significativamente diferente em relação aos controlos ( $P < 0,0001$ ), sendo os valores MOR% mais elevados observados a 50 e 25 mg mL<sup>-1</sup> (16,4 e 14,5%, respectivamente). Finalmente, foram encontradas diferenças significativas entre os tratamentos em termos de inibição da motilidade (IMOT%). O valor IMOT% mais elevado foi observado a 200 e 100 mg mL<sup>-1</sup> (85,2% e 73,1%, respectivamente).

Como mostrado nas Figuras 1 e 2, os valores de CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub> para eclosão de ovos foram 66,5 e 87,3, e 1,5 e 240,9 para inibição da motilidade em larvas do estágio HC L3.

**Tabela 2. Eficácia média (percentagem  $\pm$  Desvio Padrão) do extracto hidroalcoólico de *Kalanchoe daigremontiana* sobre *H. contortus***

Tratamento (mg mL <sup>-1</sup> )	IEH% $\pm$ DP	IMOT% $\pm$ DP	MOR% $\pm$ DP
água	3.7 $\pm$ 0.4 <sup>c</sup>	0 <sup>e</sup>	2.8 $\pm$ 1.3 <sup>cd</sup>
KD (200)	99.5 $\pm$ 0.94 <sup>a</sup>	85.2 $\pm$ 4.2 <sup>b</sup>	6.9 $\pm$ 3.1 <sup>c</sup>
KD (100)	99.5 $\pm$ 0.95 <sup>a</sup>	73.1 $\pm$ 5.3 <sup>c</sup>	13.5 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>
KD (50)	10.1 $\pm$ 0.88 <sup>b</sup>	64.8 $\pm$ 5.7 <sup>cd</sup>	16.4 $\pm$ 1.8 <sup>b</sup>



KD (25)	4.7±0.29 <sup>c</sup>	63.0±3.5 <sup>d</sup>	14.5±2.2 <sup>b</sup>
KD (12.5)	3.6±0.30 <sup>c</sup>	59.5±2.1 <sup>d</sup>	13.5±1.1 <sup>b</sup>
Ivermectina5	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
EPM	0.019	0.147	0.061
P-value	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001

KD: Extracto hidroalcoólico de *Kalanchoe daigremontiana*. IEH: inibição da eclosão de ovos. IMOT: inibição da motilidade. MOR: mortalidade. EPM: erro padrão da média. Para cada coluna, letras diferentes indicam diferenças significativas ( $\alpha = 0,05$ , teste Tukey)

### Atividade antibacteriana

Como mostra o Tabela 3, o extracto hidroalcoólico *K. daigremontiana* mostrou atividade antibacteriana tanto contra as bactérias Gram-negativas (*P. aeruginosa*) como Gram-positivas (*L. monocytogenes*, *B. subtilis*, e *S. aureus*). O CIM era 100 mg mL<sup>-1</sup> para *P. aeruginosa* e *L. monocytogenes* e 0,781 mg mL<sup>-1</sup> contra *B. subtilis* e *S. aureus*.

**Tabela 3. A concentração inibitória mínima de extracto hidroalcoólico de *Kalanchoe daigremontiana* nas bactérias Gram (+) e Gram (-)**

Bactéria	Concentração inibitória mínima (CIM)		
	KD mg mL <sup>-1</sup>	Kanamicina µg mL <sup>-1</sup>	Água
<i>E. coli</i>	SA	4	SA
<i>S. typhimurium</i>	SA	4	SA
<i>S. choleraesuis</i>	SA	1	SA
<i>P. aeruginosa</i>	100 <sup>b</sup>	64	SA
<i>L. monocytogenes</i>	100 <sup>b</sup>	2	SA
<i>B. subtilis</i>	0.781 <sup>a</sup>	8	SA
<i>S. aureus</i>	0.781 <sup>a</sup>	64	SA

KD: Extracto hidroalcoólico de *Kalanchoe daigremontiana*. SA: Sem actividade. Os diferentes literais <sup>a,b</sup> na coluna indicam diferenças estatísticas significativas ( $P \leq 0.05$ )

Os nossos resultados sugerem que o extracto hidroalcoólico de *K. daigremontiana* tem uma actividade significativa contra a eclosão *in vitro* de ovos de *H. contortus* (Figura 1). A atividade do extracto foi tão boa como a do controlo positivo (Ivermectina 5 mg mL<sup>-1</sup>), indicando a viabilidade da utilização desta espécie vegetal como agente anti-helmíntico. Uma vez que não foram encontradas diferenças significativas entre 100 e 200 mg de tratamentos mL<sup>-1</sup>, a dose mais baixa pôde ser utilizada para reduzir o risco de resistência do nemátodo ao fármaco. Curiosamente, a morte não foi o efeito principal do extracto, mas sim a inibição da motilidade.





O extracto hidroalcoólico *K. daigremontiana* é capaz de inibir a eclosão de ovos e a motilidade larvar (Figura 2). Outras moléculas derivadas de plantas, como flavonóides, flavonas, saponinas, alcalóides, xantonas (Rivero *et al.*, 2016), polifenóis (Akkari *et al.*, 2016), taninos (Desrues *et al.*, 2016) e derivados de pirazole-5-carboxamida (Jiao *et al.*, 2017), também foram relatados para reduzir a motilidade larvar. A presença em *K. daigremontiana* de flavonóides e polifenóis (Karwatzki *et al.*, 1993) foi relatada, e é viável que estes compostos desempenhem um papel na inibição da motilidade larvar.

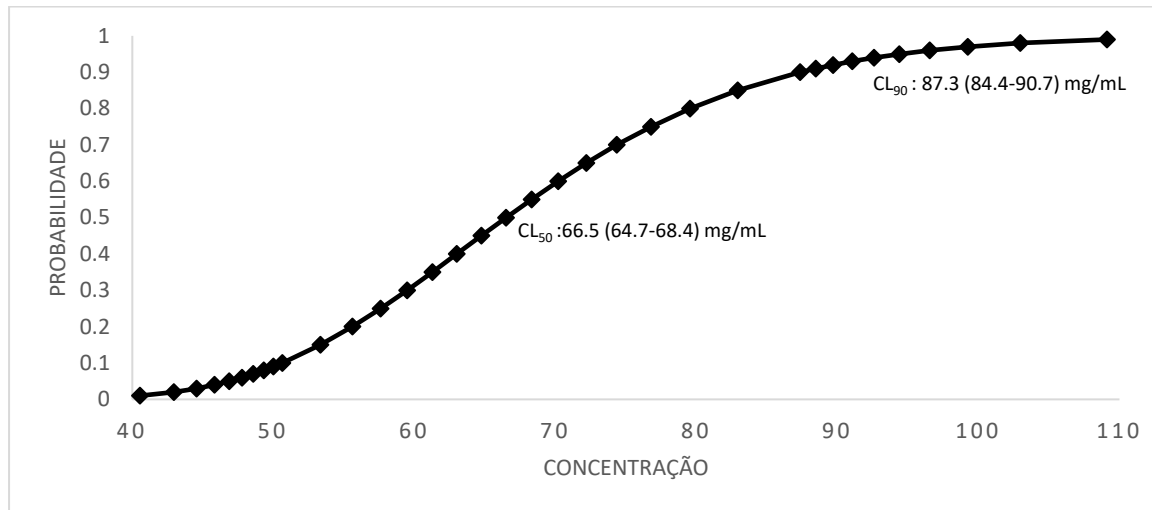


Figura 1. Concentração letal (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) de extracto hidroalcoólico de *Kalanchoe daigremontiana* para inibir a eclosão de ovos de *Haemonchus contortus*

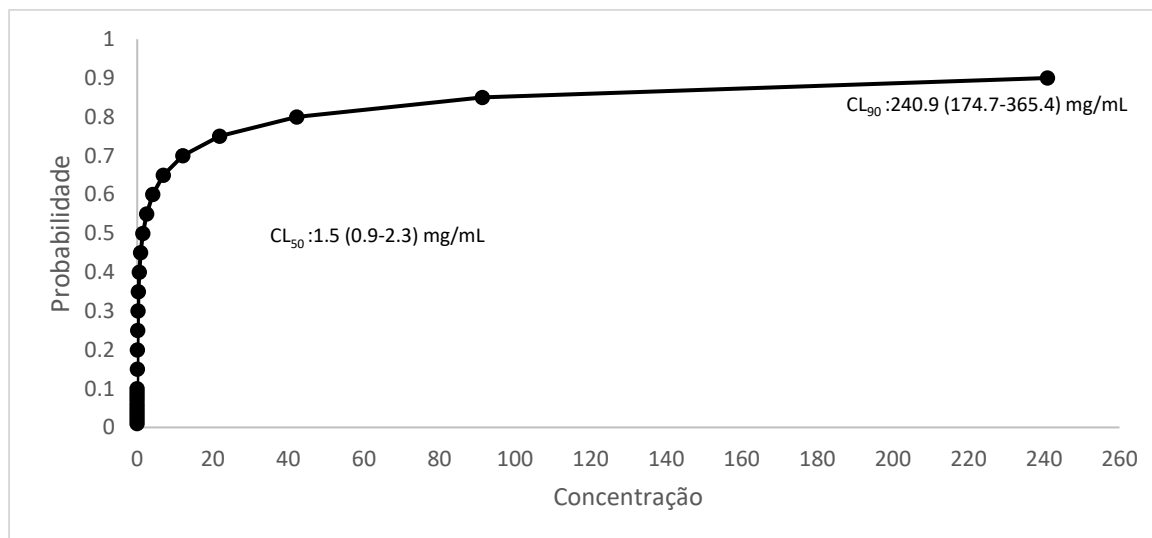


Figura 2. Concentração letal (CL<sub>50</sub> e CL<sub>90</sub>) de extracto hidroalcoólico de *Kalanchoe daigremontiana* para inibir a motilidade em larvas de *Haemonchus contortus* L3-stage

Os nossos resultados mostram que o extracto hidroalcoólico de *K. daigremontiana* inibe a motilidade das larvas do HC L3, mas não é eficaz para as matar. Isto poderia ser



relevante para o uso proposto dos extractos de *K. daigremontiana* como anti-helmíntico, uma vez que (Moradpour *et al.*, 2013) descreveram as alterações morfológicas nos tecidos abomasais devido à migração parasitária para diferentes partes de abomaso de ovelhas. Os resultados da actividade anti-helmíntica aqui relatados são semelhantes aos observados por Phatak (2013), que não encontrou qualquer actividade nos extractos metanólicos e éteres de petróleo de *Kalanchoe pinnata* sobre a sobrevivência larvar; contudo, os extractos reduziram a motilidade larvar. Ao contrário desse estudo, contudo, também avaliamos a inibição da eclosão de ovos, descobrindo que 99.5% dos ovos não eclodiram quando expostos a 100 e 200 mg mL<sup>-1</sup> do extracto, com um CL<sub>50</sub> de 66,5 mg mL<sup>-1</sup> e um CL<sub>90</sub> de 87,3 mg mL<sup>-1</sup>. De acordo com Lunkad *et al.*, (2016), extractos de espécies do subgénero *Bryophyllum*, tais como *B. pinnatum*, mostraram actividade anti-helmíntica em várias concentrações (30 e 50 mg/ml) contra minhocas indianas *Pheretima posthuman*, contando como actividade anti-helmíntica a paralisia e morte de mais de 50% dos organismos.

Um possível mecanismo de acção dos metabolitos secundários das plantas nos ovos e larvas de nemátodos como *H. contortus* envolve a inibição ou atraso do crescimento e maturação do parasita pela afinidade das glicoproteínas na cutícula do parasita com os compostos fenólicos (mediados por resíduos de prolina); os polifenóis podem ligar estas proteínas, inibindo a motilidade, alimentação e reprodução do parasita, causando eventualmente a sua morte; além disso, as saponinas têm acções membranolíticas (Hernández *et al.*, 2018; Irshad *et al.*, 2010).

Com respeito à actividade antibacteriana, o extracto hidroalcoólico de *K. daigremontiana* mostrou uma maior actividade sobre bactérias gram-positivas do que sobre bactérias gram-negativas; isto poderia ser explicado considerando que as bactérias gram-negativas têm uma membrana externa fosfolipídica e porosa; a membrana fosfolipídica que cobre os componentes lipopolissacáridos estruturais torna a parede celular impermeável aos solutos lipofílicos.

Mothana *et al.*, (2009) avaliaram 25 plantas com actividade antibacteriana, incluindo a farinacea de *Kalanchoe*. O extracto metanólico desta planta tinha actividade inibitória em *S. aureus*, *B. subtilis*, e *Staphylococcus epidermidis* multi-resistente e *S. aureus* numa concentração de 4 mg mL<sup>-1</sup>, produzindo zonas de inibição de 15 e 16-mm em culturas de *S. aureus* e *S. epidermidis* e *S. aureus* multi-resistentes, respectivamente, e zonas de inibição de 10-mm em culturas de *B. subtilis*, mas não teve efeito contra bactérias gram-negativas.

Extractos de diclorometano de folhas de *K. pinnata* produziram zonas de inibição de 18-mm quando ensaiados contra *E. coli*, mas não tiveram efeito sobre *S. aureus* nem *P. aeruginosa*. Esses resultados estão em parcial concordância com os aqui relatados. O extracto hidroalcoólico de *K. daigremontiana* não teve qualquer efeito sobre a *E. coli*, mas



foi eficaz contra a *P. aeruginosa*, com um CIM de 100 mg mL<sup>-1</sup>. O mesmo estudo relatou que o extracto metanólico continha saponinas, glicosídeos cardíacos e esteróides como metabolitos secundários com possível actividade antibacteriana.

Richwagen *et al.*, (2019) relataram actividade antibacteriana de extractos de duas espécies de *Kalanchoe*, *K. mortagei* e *K. fedtschenkoi*, contra agentes patogénicos ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter cloacae*). A inibição de crescimento superior a 50% (CL<sub>50</sub>) foi geralmente observada em concentrações de 256 µg mL<sup>-1</sup> e 128 µg mL<sup>-1</sup>.

De Souza Barboza *et al.*, (2016), corroboraram a actividade antimicrobiana de extractos aquosos de folhas e flavonóides ocorridos em *Kalanchoe pinnata* (Lam.), concentrações de 100 µg.mL<sup>-1</sup>, mostraram uma redução do crescimento superior a 50% para *Pseudomonas aeruginosa* e *Citrobacter freundii*.

Akinnibosun *et al.*, (1994) relataram que um extracto etanólico de folhas de *K. pinnata* era mais eficaz contra *S. aureus*, *E. coli*, e *P. aeruginosa* do que extractos aquosos e metanólicos da mesma planta, mostrando zonas de inibição de 17,3 ± 1,2, 12,7 ± 0,9, e 8,3 ± 0,9 mm para *S. aureus*, *E. coli*, e *P. aeruginosa*, respectivamente. Uma análise química qualitativa do extracto etanólico detectou flavonóides, esteróides, alcalóides, taninos, glicosídeos cardíacos, e açúcares redutores, juntamente com metabolitos secundários com actividade antimicrobiana relatada, principalmente saponinas e compostos fenólicos como os taninos.

## CONCLUSÃO

O presente estudo mostra o potencial efeito anti-helmíntico e antibacteriano do extracto hidroalcoólico *Kalanchoe daigremontiana*, contra *Haemonchus contortus*, bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, mostrando o melhor efeito sobre a inibição da eclosão dos ovos e a mobilidade larvar do *Haemonchus contortus* e sobre o crescimento de *B. subtilis* e *S. aureus*. Estes resultados indicam que o extracto hidroalcoólico *Kalanchoe daigremontiana* pode ser utilizado como alternativa natural para o controlo ou tratamento de doenças associadas a estes microrganismos. Embora a identificação dos metabolitos secundários associados a estas actividades biológicas seja necessária, bem como testes de toxicidade *in vitro* e *in vivo*.

## LITERATURA CITADA

ABDELFATTA S, Elghandour M, Kholif A, López S, Pliego A, Cipriano-Salazar M, Alonso M. 2017. Tree leaves of *Salix babylonica* extract as a natural anthelmintic for small-ruminant farms in a semiarid region in Mexico. *Agroforestry Systems*. 91(1):111-122. ISSN: 1572-9680. <https://doi.org/10.1007/s10457-016-9909-z>



AGUILAR-Marcelino L, Mendoza-De-Give P, Torres-Hernández G, López-Arellano M, Becerril-Pérez C, Orihuela-Trujillo A, Olmedo-Juárez A. 2016. Consumption of nutritional pellets with *Duddingtonia flagrans* fungal chlamydospores reduces infective nematode larvae of *Haemonchus contortus* in faeces of Saint Croix lambs. *Journal Helminthology*. 91(6): 665-671. ISSN: 1475-2697. <https://doi.org/10.1017/S0022149X1600081X>

AKINNIBOSUN FI, Eedionwe O. 1994. Evaluation of the phytochemical and antimicrobial potential of the leaves extracts of *Bryophyllum pinnatum* L. and *Citrus aurantifolia* Sw and their synergy. *Journal of Applied Sciences and Environmental Management*. 4:611-619. ISSN: 2659-1502. <http://dx.doi.org/10.4314/jasem.v19i4.7>

ALCALA-Canto Y, Camberos L, López H, Olvera L, Pérez G. 2016 Anthelmintic resistance status of gastrointestinal nematodes of sheep to the single or combined administration of benzimidazoles and closantel in three localities in Mexico. *Veterinaria México*. 3(4). ISSN: 2448-6760. <https://doi.org/10.21753/vmoa.3.4.374>

AISYAH LS, Yun YF, Herlina T, Julaeha E, Zainuddin A, Nurfarida I, Shiono Y. 2017. Flavonoid compounds from the leaves of *Kalanchoe prolifera* and their cytotoxic activity against P-388 murine leukimia cells. *Natural Product Sciences*. 23(2):139-145. ISSN: 2288-9027. <https://doi.org/10.20307/nps.2017.23.2.139>

AKKARI H, Hajaji S, B'Chir F, Rekik M, Gharbi M. 2016. Correlation of polyphenolic content with radical-scavenging capacity and anthelmintic effects of *Rubus ulmifolius* (Rosaceae) against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 221:46-53. ISSN: 0304-4017. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.03.007>

BASHIR L, Chishti M, Bhat F, Tak H, Bandh S, Khan A. 2017. Evaluation of anthelmintic antimicrobial and antioxidant activity of *Chenopodium album*. *Tropical Animal Health and Production*. 49(8):1597-1605. ISSN: 1573-7438. <https://doi.org/10.1007/s11250-017-1364-y>

CASTILLO-MITRE G, Olmedo-Juárez A, Rojo-Rubio R, González-Cortázar M, Mendoza-de Givesh P, Hernández-Beteta E, Zamilpa A. 2017. Caffeoyle and coumaroyl derivatives from *Acacia cochliacantha* exhibit ovicidal activity against *Haemonchus contortus*. *Journal of Ethnopharmacology*. 204: 125-131. ISSN: 0378-8741. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.04.010>

CORDERO CM, Rojo A, Hernández R, Calvalho V. Parasitología Veterinaria. Barcelona, España. Editorial McGraw-Hill Interamericana. 2000. ISBN: 84-486-0236-6 <https://dialnet.unirioja.es/servlet/libro?codigo=489596>



CRYR M, Lane K, Greer M, Cates R, Burt S, Andrus M, Johnson FB. 2017. Isolation and identification of compounds from *Kalanchoe pinnata* having human alphaherpesvirus and vaccinia virus antiviral activity. *Pharmaceutical biology*. 55(1):1586-1591. PMID: 28395583. <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1310907>

DE SOUZA BARBOZA TJE, Ferreira AEF, Ignacio ACDPR, Albarello N. 2016. Cytotoxic, antibacterial and antibiofilm activities of aqueous extracts of leaves and flavonoids occurring in *Kalanchoe pinnata* (Lam.) Pers. *Journal of Medicinal Plants Research*. 10(41):763-770. <https://doi.org/10.5897/JMPR2016.6260>

GEORGE LO, Radha HR, Somasekariah BV. 2018. In vitro anti-diabetic activity and GC-MS analysis of bioactive compounds present in the methanol extract of *Kalanchoe pinnata*. *Indian Journal of Chemistry*. 57: 1213-1221. <https://api.semanticscholar.org/CorpusID:91497628>

HERNÁNDEZ-ALVARADO J, Zaragoza-Bastida A, López-Rodríguez G, Peláez-Acero A, Olmedo-Juárez A, Rivero-Pérez N. 2018. Antibacterial and antihelmintic activity of plant secondary metabolites: approach in Veterinary Medicine. *Abanico Veterinario*. 8:14-27. ISSN: 2448-6132. <https://doi.org/10.21929/abavet2018.81.1>

HERNÁNDEZ-Villegas M, Borges-Argaez R, Rodríguez-Vivas R, Torres-Acosta J, Méndez-González M, Cáceres-Farfán M. 2011. Ovicidal and larvicidal activity of the crude extracts from *Phytolacca icosandra* against *Haemonchus contortus*. *Veterinary Parasitology*. 179 (1-3):100-106. ISSN: 0304-4017. <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2011.02.019>

HUANG HC, Lin MK, Yang HL, Hseu YC, Liaw CC, Tseng YH, Kuo YH. 2013. Cardenolides and bufadienolide glycosides from *Kalanchoe tubiflora* and evaluation of cytotoxicity. *Planta Medica*. 79(14):1362-1369. ISSN: 0032-0943. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1350646>

IRSHAD M, Man S, Rizvi MA. 2010. Assessment of anthelmintic activity of *Cassia fistula* L. *Middle East Journal of Scientific Research*. 5(5):346-349. ISSN:1999-8147. [http://www.idosi.org/mejsr/mejsr5\(5\)/5.pdf](http://www.idosi.org/mejsr/mejsr5(5)/5.pdf)

JIAO YQ, Preston S, Song HJ, Jabbar A, Liu YX, Baell J, Gasser RB. 2017. Assessing the anthelmintic activity of pyrazole-5-carboxamide derivatives against *Haemonchus contortus*. *Parasit Vectors*. 10:214-234. ISSN: 1756-3305. <https://doi.org/10.1186/s13071-017-2191-8>



KARWATZKI B, Herget A, Beerhues L, Wiermann R. 1993. *In-situ* localization of chalcone synthase in tannin-containing plants. *Phytochemistry*. 32(3):585. ISSN: 0031-9422. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)95141-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)95141-0)

KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS J, Stochmal A. 2017. Bufadienolides of *Kalanchoe* species: an overview of chemical structure, biological activity and prospects for pharmacological use. *Phytochemistry Reviews*. 16(6):1155-1171. ISSN: 1572-980X. <https://dx.doi.org/10.1007%2Fs11101-017-9525-1>

KOŁODZIEJCZYK-CZEPAS J, Nowak P, Wachowicz B, Piechocka J, Głowacki R, Moniuszko-Szajwaj B, Stochmal A. 2016. Antioxidant efficacy of *Kalanchoe daigremontiana* bufadienolide-rich fraction in blood plasma *in vitro*. *Pharmaceutical biology*. 54(12): 3182-3188. PMID: 27488985. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1214740>

LÓPEZ-AROCHE U, Salinas-Sánchez D, de Gives P, López-Arellano M, Liebano-Hernández E, Valladares-Cisneros G, Hernandez-Velázquez V. 2008. *In vitro* nematicidal effects of medicinal plants from the Sierra de Huautla, Biosphere Reserve, Morelos, México against *Haemonchus contortus* infective larvae. *Journal of Helminthology*. 82(1):25-31. ISSN:1475-2697 <https://doi.org/10.1017/S0022149X07873627>

LUNKAD AS, Agrawal MR, Kothawade SN. 2016. Anthelmintic activity of *Bryophyllum pinnatum*. *Research Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 8(1):21-24. <https://doi.org/10.5958/0975-4385.2016.00005.4>

MOTHANA R, Lindequist U, Gruenert R, Bednarski JP. 2009. Studies of the *in vitro* anticancer, antimicrobial and antioxidant potentials of selected Yemeni medicinal plants from the island Soqatra. *BMC Complementary Medicine and Therapies*. 9:7. ISSN: 2662-7671. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-9-7>

MORADPOUR N, Borji H, Razmi G, Maleki M, Kazemi H. 2013. Pathophysiology of *Marshallagia marshalli* in experimentally infected lambs. *Parasitology*. ISSN: 1469-8161 140(14):1762-1767. <https://doi.org/10.1017/s0031182013001042>

MUZITANO MF, Tinoco LW, Guette C, Kaiser CR, Rossi-Bergmann B, Costa SS. 2006. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. *Phytochemistry*. 67(18): 2071-2077. PMID: 16930642. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.06.027>



OLMEDO-Juárez A, Rojo-Rubio R, Zamilpa A, de Gives PM, Arece-García J, López-Arellano ME, von Son-de Fernex E. 2017. *In vitro* larvicidal effect of a hydroalcoholic extract from *Acacia cochliacantha* leaf against ruminant parasitic nematodes. *Veterinary Research Communications*. 41 (3):227-232. ISSN :1573-7446.

<https://doi.org/10.1007/s11259-017-9687-8>

PHATAK RS. 2016. Lack of anthelmintic activity of *Kalanchoe pinnata* fresh leaves. *Journal of Pharmaceutical Negative Results*. 7(1):21. ISSN: 2229-7723.

<https://www.pnrjournal.com/fulltext/219-1599738067.pdf?1623436039>

PRASAD PB, Prakash S, Adhikari K. 2020. LC-ESI-QTOF-MS for the Profiling of the Metabolites and in Vitro Enzymes Inhibition Activity of *Bryophyllum pinnatum* and *Oxalis corniculata* Collected from Ramechhap District of Nepal. *Chemistry & biodiversity*. 17(6): e2000155. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000155>

PREET S, Tomar R. 2017. Anthelmintic effect of biofabricated silver nanoparticles using *Ziziphus jujuba* leaf extract on nutritional status of *Haemonchus contortus*. *Small Ruminant Research*. 154:45-51. ISSN: 0921-4488.

<https://doi.org/10.1016/j.smallrumres.2017.07.002>

RICHWAGEN N, LYLES JT, Dale BL, Quave CL. 2019. Antibacterial activity of *Kalanchoe mortagei* and *K. fedtschenkoi* against ESKAPE pathogens. *Frontiers in pharmacology*, 10, 67. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00067>

RIVERO-PÉREZ N, Ayala-Martinez M, Zepeda-Bastida A, Meneses-Mayo M, Ojeda-Ramirez D. 2016. Anti-inflammatory effect of aqueous extracts of spent *Pleurotus ostreatus* substrates in mouse ears treated with 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *The Indian Journal of Pharmacology*. 48:141-144. ISSN: 0253-7613.

<https://ijp-online.com/article.asp?issn=0253-7613;year=2016;volume=48;issue=2;spage=141;epage=144;aulast=Rivero-Perez;type=0>

SANTOS FO, de Lima HG, Santos N, Serra T, Uzeda RS, Reis IMA. 2017. Batatinha, MJM. *In vitro* anthelmintic and cytotoxicity activities the *Digitaria insularis* (Poaceae). *Veterinary Parasitology*. 245:48-54. ISSN:0304-4017.

<https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2017.08.007>

SANOS S, Zurfluh L, Mennet M, Potterat O, Von Mandach U, Hamburger M, Simões-Wüst, AP. 2021. *Bryophyllum pinnatum* Compounds Inhibit Oxytocin-Induced Signaling Pathways in Human Myometrial Cells. *Frontiers in Pharmacology*.12:142.

<https://doi.org/10.3389/fphar.2021.632986>



SINGAB AB, El-Ahamdy SH, Labib RM, Fekry SS. *Kalanchoe thrysiflora* Harv. And *Kalanchoe marmorata* Baker; DNA Profiling, biological guided fractionation of different extracts; isolation and identification of cytotoxic compounds. 2012. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. 02 (08): 215-220. ISSN: 2231-3354.

[http://japsonline.com/admin/php/uploads/652\\_pdf.pdf](http://japsonline.com/admin/php/uploads/652_pdf.pdf)

SUPRATMAN U, Fujita T, Akiyama K, Hayashi H. 2000. New insecticidal bufadienolide, bryophyllin C, from *Kalanchoe pinnata*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 64(6): 1310-1312. PMID: 10923811. <https://doi.org/10.1271/bbb.64.1310>

SUPRATMAN, U, Fujita T, Akiyama K, Hayashi H. 2001. Insecticidal compounds from *Kalanchoe daigremontianax tubiflora*. *Phytochemistry*. 58(2): 311-314. PMID: 11551556 [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00199-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00199-6)

SUPRATMAN U, Fujita T, Akiyama K, Hayashi H, Murakami A, Sakai H, Ohigashi H. 2001. Anti-tumor Promoting Activity of Bufadienolides from *Kalanchoe pinnata* and *K. daigremontianax butiflora*. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*. 65(4): 947-949. PMID: 11388478. <https://doi.org/10.1271/bbb.65.947>

STEFANOWICZ-HAJDUK J, Asztemborska M, Krauze-Baranowska M, Godlewska S, Gucwa M, Moniuszko-Szajwaj B, Ochocka JR. 2020. Identification of flavonoids and bufadienolides and cytotoxic effects of *Kalanchoe daigremontiana* extracts on human cancer cell lines. *Planta medica*. 86(04): 239-246. PMID: 31994149.

<https://doi.org/10.1055/a-1099-9786>

STEFANOWICZ-HAJDUK J, Hering A, Gucwa M, Hałasa R, Soluch A, Kowalczyk M, Ochocka R. 2020. Biological activities of leaf extracts from selected *Kalanchoe* species and their relationship with bufadienolides content. *Pharmaceutical Biology*. 58(1):732-740. PMID: 32715869. <https://doi.org/10.1080/13880209.2020.1795208>

XING LZ, Ni HJ, Wang L. 2017. Quercitrin attenuates osteoporosis in ovariectomized rats by regulating mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathways. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 89: 1136-1141. PMID: 28314242.

<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.02.073>

Errata Erratum

<https://abanicoacademico.mx/revistasabanico-version-nueva/index.php/abanico-veterinario/errata>